

# **PRODUÇÃO DE LÍPIDOS ESTRUTURADOS A PARTIR DE ÓLEO DE GRAINHA DE UVA CATALISADA POR LIPASES NÃO COMERCIAIS**

**Carolina Maria Malta da Costa**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente

Coorientador: Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório

## **Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão, Professora Adjunta da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio de algumas pessoas, às quais desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Suzana Ferreira Dias, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento na presente tese, pela disponibilidade, confiança e amizade reveladas ao longo deste ano, assim como por todas as correções e sugestões feitas durante a orientação.

À Professora Natália Osório, pela co-orientação desta tese, pelos conhecimentos transmitidos, esclarecimento de dúvidas e ajuda na realização da parte prática.

Ao Professor Doutor Jorge Gominho pelo auxílio, disponibilidade e paciência para resolver os inúmeros contratempos que aconteceram com o cromatógrafo gasoso.

Ao grupo do Professor Francisco Valero da Universidade Autónoma de Barcelona, pelo fornecimento da lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*, sem a qual não teria sido possível a realização deste trabalho e pelas sugestões ao longo do mesmo.

Ao grupo da Doutora Georgina Sandoval do Centro de Investigação e Assistência em Tecnologia e Desenho do Estado de Jalisco, pelo fornecimento da lipase *Carica papaya* auto-imobilizada no látex.

À minha querida amiga Acenini Balieiro que me ensinou com prazer e dedicação boa parte dos conhecimentos laboratoriais essenciais à realização deste trabalho, assim como pela amizade mútua que surgiu tão espontaneamente. Foi muito mais alegre trabalhar contigo perto de mim.

À Joana Rodrigues, pelo auxílio prestado no laboratório, pela amizade, acompanhamento e paciência no esclarecimento de inúmeras dúvidas, e, especialmente, à tranquilidade e confiança que me transmitiu.

Às minhas melhores amigas, Mariana Dias, Diana Silva e Margarida Freire, que, sempre presentes, andaram lado a lado comigo durante todo este percurso, sempre companheiras e otimistas.

Um agradecimento muito especial a toda a minha família, que sempre acreditou nas minhas capacidades, me deu força, me ajudou e me apoiou incondicionalmente em todos os momentos da minha vida.

Obrigada a todos!

## RESUMO

Neste estudo pretendeu-se produzir lípidos estruturados, nomeadamente, sucedâneos da gordura de leite humano (SGLH) e triacilgliceróis (TAG) dietéticos do tipo MLM, a partir de óleo de grinha de uva (OGU).

As reações de acidólise decorreram em descontínuo, em meio livre de solvente e foram catalisadas pela lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL) imobilizada em Amberlite™ IRA96 e pela lipase de *Carica papaya* (CPL) auto-imobilizada no látex.

Na produção de SGLH, a 60 °C, utilizou-se a tripalmitina como fonte de TAG, e o OGU como fonte de ácidos gordos polinsaturados, especialmente C18:2. O rendimento em novos TAG foi de 10,4 % (m/m) com a rROL. A CPL revelou-se incapaz de catalisar esta reação. A produção de MLM realizou-se a 40 °C, por acidólise do OGU com ácido caprílico (C8:0) ou cáprico (C10:0) e os rendimentos em TAG novos variaram entre 36,2 e 66,8 % (m/m).

Assim prosseguiram-se com ensaios a 30, 40 e 50 °C, durante 48h, de produção de MLM, tendo-se verificado maiores produções de TAG novos a 40 °C com ambos os biocatalisadores.

Realizaram-se testes de estabilidade operacional a 40 °C, tendo-se obtidos tempos de meia vida de 166 e 91h para a rROL e 96 e 81h para a CPL, respetivamente, na acidólise de OGU com C8:0 ou C10:0.

**Palavras-Chave:** Lípidos estruturados, Lípidos dietéticos, Sucédâneos da gordura de leite humano, Óleo de grinha de uva, Lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*, Látex de *Carica papaya*.

## ABSTRACT

The aim of this study was the production of structured lipids, namely, human milk fat substitutes (HMFS), and low calorie triacylglycerols (TAG) of the MLM type, using grapeseed oil (GO).

The acidolysis reactions were performed in batch, in solvent-free systems and catalyzed by the heterologous lipase from *Rhizopus oryzae* (rROL) immobilized in Amberlite™ IRA 96 or by *Carica papaya* lipase (CPL) self-immobilized in papaya latex.

In the HMFS production, at 60 °C, tripalmitin was used as source of TAG, and GO as source of polyunsaturated fatty acids, especially C18:2. The obtained yield in new TAG was 10.4 % (w/w) with rROL. The CPL showed to be enable to catalyze this reaction. The MLM production occurred at 40 °C, by acydolysis between GO and caprylic (C8:0) or capric (C10:0) acids, and the yields in new TAG varied between 36.2 and 66.8 % (w/w).

Thus, MLM production reactions were carried out at 30, 40 and 50 °C, during 48h, and the major productions of new TAG were achieved at 40 °C, with both biocatalysts.

Operational stability tests, at 40°C, were carried out, and the half-life times obtained were 166 and 91h for rROL and 96 and 81h for CPL, respectively, in GO acidolysis with C8:0 and C10:0.

**Keywords:** Structured lipids, Low calorie lipids, Human milk fat substitutes, Grapeseed oil, Lipase from *Rhizopus oryzae*, *Carica papaya* latex.

## EXTENDED ABSTRACT

Lipids are essential constituents of food diet, mainly because of their high energy value and for being a good source of bioactive compounds such as liposoluble vitamins, antioxidants and essential fatty acids. The modification of lipid structure, by the ability to combine fatty acids with different beneficial characteristics in a unique triacylglycerol (TAG) molecule, is a food industry growing segment, aimed to achieve natural and healthier fats, as a response to the current consumer's demand.

Functional, nutritional and organoleptic properties of fats depend on (i) their composition of saturated and polyunsaturated fatty acids (FA), (ii) fatty acids chain length and (iii) on the distribution of the different fatty acids in triacylglycerols (*sn*-1, *sn*-3 or *sn*-2 positions). Thus, novel TAG can be obtained (i) by the incorporation of new fatty acids (FA), (ii) by changing the positions of FA or the FA profile, from the natural state, or (iii) by the synthesis of completely new TAG. These modified fats, known as structured lipids (SL) or "taylor-made fats", can be produced either chemically or enzymatically. They present important medical and functional properties for food applications.

In the area of oils and fats, the use of lipases as catalysts for the production of structured lipids with functional and specific properties as greatly increased during the last decades. The inorganic catalysts have been replaced by lipases because of enzymatic benefits with respect to chemical processes. The lipases are enzymes which catalyze the hydrolysis of esters in aqueous medium. Lipase-catalyzed reactions occur under mild conditions (temperature lower than 70 °C and atmospheric pressure) and with higher selectivity than with the inorganic catalysts.

The human milk is an example of natural and functional food with 4-5% of fat which provides to infants the major fraction of energy needed, as well as some nutrients and other important components. The human milk fat substitutes (HMFS) were developed from the need to create a food able to supply nutritional needs of the newborns, when they cannot be breastfed for many reasons which are inherent to the mother's inability. Thus, milk infant formulas whose lipid composition should be equal to that found naturally in human milk fat is a real need for the industry.

In human milk fat (HMF), unlike in vegetable oils and in cow's milk fat, palmitic acid (20-30%), the major saturated fatty acid, is mostly esterified at the internal position of TAG, while unsaturated fatty acids are at the external positions. The palmitic acid location in *sn*-2 position of the human milk fat TAG increases the fatty acid absorption in infants' intestine and decreases the loss of calcium in their faeces. Thus, the use of both vegetable oils and cow's milk as human milk fat substitutes in infants' formulations can cause a deficit of calcium and fatty acids absorption. This is due to the formation of insoluble calcium salts with saturated fatty acids (e.g. calcium palmitate) which are released by the action of *sn*-1,3 pancreatic lipase during digestion.

Therefore, the production of HMFS that mimics, as closely as possible, the structure and composition of human milk fat, is a challenge for the food industry. Nowadays, the commercial product named Betapol™, produced by "Lipid Nutrition" (Netherlands), is used as human milk fat

substitute. It is formed by TAG mainly OPO (oleic acid in external positions and the palmitic acid in TAG internal position), obtained by interesterification of natural vegetable oils, catalysed by a *sn*-1,3 specific lipase.

As other example of structured lipids, TAG containing medium chain fatty acids (M) esterified at *sn*-1,3 positions and long chain fatty acids (L) esterified at *sn*-2 position of the glycerol backbone, known as MLM, have attracted much attention mainly because of their low caloric value and nutritional interest for persons with malabsorption problems. In fact, these low calorie structured lipids have about 5 to 7 kcal/g, a lower caloric value than conventional oils and fats with 9 kcal/g. During digestion, the medium chain fatty acids, released from TAG by the action of the *sn*-1,3-specific pancreatic lipase, are preferentially transported via the portal vein to the liver because they have higher solubility than have long chain fatty acids, where they are metabolised as rapidly as glucose. Since they are not readily re-esterified into new TAG, they have little tendency to accumulate in the body as stored fat, with weight control benefits. These structured lipids can be enzymatically produced, usually by acidolysis between a long-chain fatty acid oil and free medium chain fatty acids (e.g. caprylic or capric acids), using *sn*-1,3 specific lipases. However, most dietary SL commercially available are produced by chemical interesterification such as Structolipid™, produced by “*Pharmacia & Upjohn AB*” (Sweden), contain a mixture of MCFA and LCFA; and another one, Caprenin™, produced by “*Procter & Gamble*” (USA), which consists of TAG containing caprylic, capric and behenic acids.

The production of modified TAG in their fatty acid composition is currently performed by the acidolysis reaction between an ester and a free fatty acid. The use of *sn*-1,3 selective lipases for the production of HMFS will maintain the palmitic acid in the internal position of acilglycerols. In the production of MLM, the lipases will guarantee the presence of medium-chain fatty acids in positions *sn*-1,3 and of long-chain fatty acids in the *sn*-2 position, which is nutritionally desirable and it is not possible by the chemical route.

Among long-chain fatty acids, linoleic acid (C18:2) is particularly important since it is an essential fatty acid for humans. In Mediterranean region, where wine making is an important agri-business, grapeseed oil can be a source of this fatty acid (85 % of C18:2) to be used for HMFS and MLM productions.

This study aims the production of structured lipids, namely, human milk fat substitutes, and low calorie triacylglycerols of the MLM type, from grapeseed oil.

A recombinant *sn*-1,3 regioselective *Rhizopus oryzae*, produced by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, immobilized on Amberlite IRA96™, and *Carica papaya* lipase self-immobilized in papaya latex, were tested as biocatalysts. The acidolysis reactions were performed in stirred-reactor batch, solvent-free system and at atmospheric pressure.

In the HMFS production, at 60 °C, tripalmitin was used as source of TAG, and grapeseed oil as source of polyunsaturated fatty acids, especially C18:2 (molar ratio FFA:TAG = 2:1). The

obtained yield in new TAG was 10.4 % (w/w) with rROL. The CPL showed to be enable to catalyze this reaction.

The MLM production occurred at 40 °C, by acydolysis between grapeseed oil and caprylic or capric acids (molar ratio M:TAG = 2:1). The obtained yields in new TAG varied between 36.2 and 66.8 % (w/w). Considering this results, we decided to continue with the study of MLM synthesis instead of HMFS.

Thus, MLM production reactions were carried out at 30, 40 and 50 °C, during 48h, and the major productions of TAG news were achieved at 40 °C, with both biocatalysts. A *quasi*-equilibrium was attained after 24h reaction time in most systems, for the three temperatures studied.

Operational stability tests, at 40 °C, were carried out, and the half-life times obtained were 166 and 91h for rROL and 96 and 81h for CPL, respectively, in grapeseed oil acidolysis with C8:0 and C10:0. These results showed a greater operational stability for both biocatalysts when in presence of C8:0, and exhibiting a first-order deactivation kinetics.

The obtained results show that these non-commercial biocatalysts are potential alternatives to the high-cost immobilized commercial lipases for MLM production. However, more studies and investments must be made in order to increase the stability of these biocatalysts, and to make this bioprocess economically feasible at industrial scale.

## ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>EXTENDED ABSTRACT .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE QUADROS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Propriedades físico-químicas e funcionais dos lípidos .....	5
2.2. Os lípidos estruturados .....	8
2.2.1. Definição e aspetos gerais .....	8
2.2.2. Métodos de produção de lípidos estruturados .....	8
2.2.2.1. Síntese química.....	9
2.2.2.2. Síntese enzimática .....	10
2.2.2.2.1. Parâmetros que influenciam a atividade e estabilidade enzimáticas .....	12
2.2.2.2.2. Produção de sucedâneos da gordura de leite humano .....	16
2.2.2.2.3. Produção de triacilgliceróis dietéticos.....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1. Materiais .....	22
3.1.1. Biocatalisadores e suportes de imobilização .....	22
3.1.2. Substratos .....	22
3.1.3. Reagentes e outros materiais .....	23
3.1.4. Equipamentos.....	24
3.2. Métodos .....	25
3.2.1. Preparação dos ácidos gordos livres .....	25



3.2.2. Imobilização da lipase heteróloga de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	26
3.2.3. Ensaios de acidólise enzimática .....	30
3.2.4. Ensaios cinéticos de acidólise e estudo da influência da temperatura na reação ..	31
3.2.5. Ensaios de estabilidade operacional dos biocatalisadores .....	31
3.2.6. Análise dos produtos de reação.....	32
3.2.6.1. Derivatização e análise por cromatografia gasosa.....	32
3.2.6.2. Quantificação dos substratos e produtos da reação .....	33
3.2.6.3. Análise estatística .....	38
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
4.1. Rendimento de imobilização de rROL em Amberlite™ IRA96 .....	39
4.2. Determinação da atividade hidrolítica dos biocatalisadores .....	39
4.3. Ensaios de síntese de lípidos estruturados .....	40
4.3.1. Síntese de sucedâneos da gordura de leite humano .....	40
4.3.2. Síntese de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM .....	42
4.4. Influência da temperatura na reação de produção de triacilgliceróis dietéticos .....	46
4.5. Estabilidade operacional dos biocatalisadores .....	51
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>55</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> – Metabolismo e transporte de triacilgliceróis em crianças e em adultos.....	6
<b>Figura 2.2.</b> – Estrutura dos principais triacilgliceróis da gordura de leite humano vs. estrutura dos principais triacilgliceróis de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal.....	17
<b>Figura 2.3.</b> – Esquema representativo da reação de produção de HMFS por acidólise entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres do óleo de grinha de uva, catalisada por uma lipase <i>sn</i> -1,3 seletiva.....	18
<b>Figura 2.4.</b> – Representação esquemática da síntese de “Betapol” por acidólise entre tripalmitina e ácido oleico, catalisada pela lipase <i>sn</i> -1,3 específica de <i>Rhizomucor miehei</i> .....	18
<b>Figura 2.5.</b> – Esquema representativo da reação de produção de MLM por acidólise entre os triacilgliceróis do óleo de grinha de uva e o ácido caprílico, catalisada por uma lipase <i>sn</i> -1,3 seletiva.....	20
<b>Figura 3.1.</b> – Exemplo de uma placa de TLC de sílica gel, sendo visível a banda dos ácidos gordos livres.....	26
<b>Figura 3.2.</b> – Curva de calibração obtida para o padrão de BSA.....	28
<b>Figura 3.3.</b> – Reator cilíndrico de vidro de parede dupla.....	30
<b>Figura 3.4.</b> – Cromatogramas relativos, respetivamente, às 0h (A) e 48h (B) de uma das reações de acidólise entre os triacilgliceróis do óleo de grinha de uva e o ácido caprílico, catalisada pela rROL para a produção de MLM.....	30
<b>Figura 3.5.</b> – Cromatogramas relativos, respetivamente, às 0h (A) e 48h (B) de uma das reações de acidólise entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres do óleo de grinha de uva, catalisada pela rROL para a produção de HMFS.....	35
<b>Figura 3.6.</b> – Curva de calibração para o ácido linoleico.....	36
<b>Figura 3.7.</b> – Curvas de calibração para o ácido caprílico e para o ácido cáprico.....	36
<b>Figura 3.8.</b> – Curvas de calibração para a tripalmitina e para a trioleína.....	37
<b>Figura 4.2.</b> – Exemplo de cromatogramas das 0h, 24h e 48h de uma das reações de acidólise entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres do óleo de grinha de uva, catalisada pela lipase de <i>Carica papaya</i> para a produção de HMFS.....	40
<b>Figura 4.3.</b> – Cromatogramas relativos, respetivamente, às 0h (A) e 48h (B) de uma das reações de acidólise entre os triacilgliceróis do óleo de grinha de uva e o ácido cáprico, catalisada pela lipase rROL, para a produção de MLM.....	43

<b>Figura 4.4.</b> – Rendimentos em TAG novos para os quatro sistemas de produção de MLM, às 24 e 48h de reação.....	44
<b>Figura 4.5.</b> – Consumo de TAG iniciais para os quatro sistemas de produção de MLM, às 24 e 48h de reação.....	45
<b>Figura 4.6.</b> – Consumos de ácido caprílico ou cáprico, para os quatro sistemas de produção de MLM, às 24 e 48h de reação.....	46
<b>Figura 4.7.</b> – Evolução do consumo de TAG e de ácido caprílico, e da produção de TAG novos, ao longo de 48h de reação de acidólise entre o óleo de grinha de uva e o ácido caprílico, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela rROL imobilizada em IRA96.....	47
<b>Figura 4.8.</b> – Evolução do consumo de TAG e de ácido cáprico, e da produção de TAG novos, ao longo de 48h de reação de acidólise entre o óleo de grinha de uva e o ácido cáprico a 30, 40 e 50 °C catalisada pela rROL imobilizada em IRA96.....	47
<b>Figura 4.9.</b> – Evolução do consumo de TAG e de ácido caprílico, e da produção de TAG novos, ao longo de 48h de reação de acidólise entre o óleo de grinha de uva e o ácido caprílico, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela lipase de <i>Carica papaya</i> .....	48
<b>Figura 4.10.</b> – Evolução do consumo de TAG e de ácido caprílico, e da produção de TAG novos, ao longo de 48h de reação de acidólise entre o óleo de grinha de uva e o ácido cáprico, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela lipase de <i>Carica papaya</i> .....	48
<b>Figura 4.11.</b> – Velocidades iniciais de formação de TAG novos para 30, 40 e 50 °C, e rendimento em TAG novos após 48h de reação, nos quatro sistemas em análise para a produção de MLM, catalisada por rROL ou pela lipase de <i>Carica papaya</i> .....	49
<b>Figura 4.12.</b> – Atividade residual dos biocatalisadores ao fim de 5 reutilizações de 48h a 40 °C, para a produção de MLM, medida pelo rendimento em TAG novos.....	52

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Métodos de produção de lípidos estruturados.....	8
<b>Quadro 2</b> – Composição em ácidos gordos do óleo de gralha de uva (% molar).....	23
<b>Quadro 3</b> – Soluções utilizadas para traçado da curva padrão para a albumina bovina.....	27
<b>Quadro 4</b> – Resultados de incorporação molar de ácidos gordos livres catalisada pela rROL e pela lipase de <i>Carica papaya</i> , em diferentes meios reacionais e em diferentes estudos.....	42
<b>Quadro 5</b> – Razão entre o número de moles de ácido linoleico libertadas e o número de moles de ácido caprílico ou de ácido cáprico consumidas, para os sistemas de produção de MLM após 48h de acidólise.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG – Ácidos gordos

AGL – Ácidos gordos livres

$A_w$  – Atividade da água

DAG - Diacilgliceróis

DHA – *Docosahexaenoic acid* – Ácido docosa-hexenóico

CPL – *Carica papaya* látex

EFA – *Essential Fatty Acids* – Ácidos gordos essenciais

EPA – *Eicosapentaenoic acid* - Ácido eicosa-pentenóico

HMF – *Human milk fat* – Gordura do leite humano

HMFS – *Human Milk Fat Substitutes* – Substitutos da gordura do leite humano

L – Ácido gordo de cadeia longa

LLL - Trilinoleína

LCFA – *Long chain fatty acids* – Ácidos gordos de cadeia longa

M – Ácido gordo de cadeia média

MAG – Monoacilgliceróis

MLM – *Medium Long Medium* – Triacilgliceróis contendo um ácido gordo de cadeia média nas posições *sn*-1,3 e um ácido gordo de cadeia longa na posição interna

MCFA – *Medium chain fatty acids* – Ácidos gordos de cadeia média

MUFA – *Monounsaturated fatty acid* – Ácidos gordos monoinsaturados

OGU – Óleo de grainha de uva

PPP - Tripalmitina

PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids* - Ácidos gordos polinsaturados

rROL – Lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*

$R^2$  – Coeficiente de determinação

SCFA – *Short-Chain Fatty Acids* – Ácidos gordos de cadeia curta

SFA – *Saturated Fatty Acids* – Ácidos gordos saturados

SL – *Structured lipids* – Lípidos estruturados

TAG – Triacilgliceróis

$t_{1/2}$  – Tempo de meia vida

## 1. ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJETIVOS

Ao longo dos últimos anos a sociedade, principalmente nos países desenvolvidos, sofreu um grande crescimento económico, tornando-se menos rural e mais urbana, e a crescente industrialização impulsionou a melhoria do nível de vida (Howlett, 2008).

Apesar do acesso fácil a uma grande variedade de alimentos, a tendência é o consumo de refeições de preparação rápida, o *fastfood*, e regimes alimentares muito ricos em gorduras saturadas e sal, e pobres em frutos e vegetais frescos. Esta dieta, associada ao sedentarismo e ao *stress*, é responsável pelo aumento da obesidade e hipertensão arterial (Gunstone, 2008).

O ritmo de vida atual originou uma rotina diária que além de exigir menos atividade física, deixa menos tempo livre para atividades compensatórias, como o desporto. Estas mudanças criaram dificuldades crescentes na manutenção de uma dieta equilibrada e balanceada, nomeadamente na ingestão e no gasto de energia (Howlett, 2008).

Por consequência, os problemas de saúde atuais estão a originar uma mudança de atitude do consumidor, levando-o a querer regressar às origens, procurando alimentos naturais e saudáveis e revelando preferência por processos naturais. Na mente do consumidor, os processos químicos podem estar associados à origem de alguns dos problemas de saúde atuais, tais como o cancro.

No entanto, uma melhor e mais adequada valorização dos potenciais benéficos dos nutrientes e de outros componentes da dieta, tornou possível a criação de produtos alimentares com características específicas capazes de influenciar diversas funções do organismo, para além de reunir as necessidades nutricionais básicas. Estes alimentos têm vindo a ser conhecidos como alimentos funcionais, ou seja, alimentos que têm adicionalmente o potencial de promover a saúde a longo prazo e o bem-estar geral (Howlett, 2008).

Os lípidos são constituintes essenciais da dieta alimentar devido ao seu elevado valor energético, são fonte de compostos bioativos tais como vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), antioxidantes e ácidos gordos essenciais (ácido linoleico e ácido linolénico) (Ribeiro e Seravalli, 2007). Como fonte de ácido linoleico tem-se, por exemplo, o óleo de graminha de uva, que é extraído das sementes do fruto da planta *Vitis vinifera*, característica da região Mediterrânica e muito associada à atividade vinícola. As graminhas das uvas contêm cerca de 6 a 20% de óleo e são ricas principalmente em ácido linoleico ( $\approx 85\%$ ) mas também ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico (Severino, 2014).

Como subproduto do setor enológico, a produção de óleo de graminha de uva é uma ideia interessante do ponto de vista económico, ao constituir uma possível fonte de receita, dado o preço a que é vendido (15-25 €/kg). Repare-se que, por cada 100 L de vinho produzidos, geram-se cerca de 30 kg de resíduos sólidos (0,05 €/kg), dos quais 7 kg correspondem a graminhas de uva (0,5 €/kg). De acordo com o Relatório Estatístico sobre a Vitivinicultura no Mundo, de 2012, elaborado pela Organização Internacional do Vinho e da Vinha, foram produzidos, em todo o mundo, cerca de 265 MHL de vinho em 2011. Fazendo um balanço de massas, os 265 MHL de

vinho produzidos dariam origem a cerca de  $79,5 \times 10^8$  kg de resíduos sólidos, dos quais  $18,6 \times 10^8$  kg corresponderiam a grainhas de uva. Admitindo que o rendimento da extração mecânica do óleo de grinha de uva é cerca de 75 %, e que as grainhas têm cerca de 15 % de óleo, conseguir-se-ia uma produção de cerca de 1,9 Mt de óleo de grinha de uva, para aquele ano. Assim, este óleo, além de constituir uma excelente fonte de ácido linoleico, é muito interessante sob o ponto de vista económico, pelo que as suas potencialidades merecem ser exploradas.

Como nos últimos anos a indústria alimentar tem procurado obter gorduras naturais e mais saudáveis de acordo com as exigências do consumidor, têm surgido novos óleos e gorduras com elevado interesse nutricional e dietético, designados por lípidos estruturados (*Structured Lipids*, SL). Neste âmbito, a modificação da estrutura dos lípidos, pela capacidade de combinar características benéficas dos diferentes ácidos gordos numa única molécula de triacilglicerol, reforça a importância que o papel dos óleos e gorduras têm nos alimentos, na nutrição e na saúde (Osborn e Akoh, 2002).

Os lípidos estruturados são óleos ou gorduras cujas propriedades nutricionais e físicas foram melhoradas, por modificação (i) da composição em ácidos gordos ou (ii) na distribuição de ácidos gordos originais no esqueleto de glicerol, por via química ou por via enzimática (Osborn e Akoh, 2002). À modificação nas posições relativas dos resíduos acilo entre TAG, dá-se o nome de interesterificação. A interesterificação de gorduras tem como objetivos a modificação das propriedades físicas das gorduras (e.g. comportamento plástico, modo de cristalização, ponto de fusão), a manutenção da sua composição original em ácidos gordos (manutenção dos ácidos gordos essenciais) e a ausência de formação de isómeros *trans*, para aplicações tecnológicas como no fabrico de margarinas e na indústria farmacêutica.

Dentro dos lípidos estruturados obtidos por modificação da sua composição em ácidos gordos, existem os TAG dietéticos do tipo SLS, MMM ou MLM; os sucedâneos da manteiga de cacau e os sucedâneos da gordura de leite humano, que podem ser produzidos por acidólise.

Os sucedâneos da gordura de leite humano (*Human Milk Fat Substitutes*, HMFS), surgiram da necessidade de se criar um alimento capaz de suprir as necessidades nutricionais humanas dos primeiros meses de vida, visto que alguns bebés não são amamentados por opção ou por impossibilidade por parte da mãe. Assim, surgiram formulações de leite para lactentes cuja composição lipídica deve ser igual à que é encontrada naturalmente na gordura do leite humano. Estes sucedâneos de gordura de leite humano devem ser TAG em que o ácido palmítico (C16:0) está preferencialmente na posição *sn*-2, enquanto os ácidos mono ou polinsaturados se encontram esterificados nas posições *sn*-1 e *sn*-3 (Forsyth, 1998).

Ainda no âmbito dos lípidos estruturados, existem os triacilgliceróis do tipo MLM (Medium-Long-Medium) são constituídos por ácidos gordos de cadeia média, M, nas posições externas (*sn*-1 e *sn*-3) e por ácidos gordos de cadeia longa, L, na posição interna (*sn*-2) do esqueleto de glicerol. Estes TAG constituem um exemplo de lípidos estruturados dietéticos pois apresentam um valor calórico de cerca de 5 a 7 kcal/g, valor inferior ao dos óleos e gorduras convencionais, de cerca de 9 kcal/g (Xu, 2000).

Os MLM são úteis no controlo da obesidade e são também recomendados para indivíduos com insuficiência pancreática e com outros problemas de má absorção, especialmente fibrose cística. Também podem ser incorporados em bebidas para desportistas devido à libertação rápida de energia (Akoh e Min, 2002).

Tanto a produção de TAG dietéticos do tipo MLM, como a produção de sucedâneos da gordura de leite humano, podem ser feitos com recurso à catálise enzimática. Esta oferece diversas vantagens face ao método convencional químico, nomeadamente devido às características de regio e estereo-seletividade e especificidade das lipases. De facto, nas últimas décadas, a pesquisa de lipases capazes de catalisar reações destinadas à produção de lípidos estruturados com propriedades funcionais específicas aumentou significativamente, tem vindo a substituir progressivamente os catalisadores inorgânicos usados comumente (Xu, 2000).

Devido a todas estas características benéficas, os lípidos estruturados, também conhecidos como *Tailor-made Fats*, têm vindo a constituir um segmento crescente na indústria alimentar, trazendo novos desafios ao mercado, além de levantarem questões sobre a forma como o organismo humano reage a estes produtos (Akoh *et al.*, 1998), pelo que a comunidade científica deve investigar melhor esta área.

Assim, o presente trabalho pretende ser mais um contributo para o avanço na investigação da síntese enzimática de lípidos estruturados, a partir de lipases não comerciais, com vista à aplicação à escala industrial.

Esta tese surge na sequência de estudos anteriores sobre a produção de lípidos estruturados com recurso à catálise enzimática (Silva, 2009; Tecelão, 2011; Nunes, 2011; Simões, 2011; Faustino, 2014; Severino, 2014).

O objetivo principal do trabalho realizado no âmbito desta tese consiste no estudo da produção de dois tipos de lípidos estruturados, os HMFS e os MLM, a partir de óleo de grinha de uva, catalisada por lipases não comerciais *sn*-1,3 seletivas.

Na síntese de lípidos estruturados HMFS, pretendeu-se produzir TAG ricos em ácido palmítico na posição interna e em ácidos polinsaturados de cadeia longa, principalmente o ácido linoleico, provenientes do óleo de grinha de uva, nas posições externas do TAG. A produção de lípidos estruturados do tipo MLM pretendeu produzir TAG ricos em ácido linoleico em posição *sn*-2 e em ácidos gordos de cadeia média C8:0 ou C10:0, nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do esqueleto de glicerol.

Assim, numa primeira fase, realizaram-se ensaios de acidólise entre ácidos gordos livres (AGL) do óleo de grinha de uva e tripalmitina, para a síntese de HMFS, e entre óleo de grinha de uva e ácido caprílico ou cáprico, para a produção de MLM. Ambos os ensaios foram catalisados pela lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*, imobilizada em Amberlite<sup>TM</sup> IRA 96 e pela lipase de *Carica papaya*, auto-imobilizada no látex. Os ensaios foram realizados em reatores descontínuos, em meio livre de solvente, pretendendo-se investigar se existe produção de novos TAG mediante os meios e condições reacionais estabelecidos. Com base nos resultados



obtidos, optou-se pelo estudo mais aprofundado dos lípidos estruturados com maiores rendimentos de produção de novos TAG.

Numa segunda fase, pretendeu-se seleccionar qual o melhor biocatalisador e meio reacional para a produção destes lípidos estruturados. Para tal, investigou-se o efeito da temperatura na cinética das reações, de forma a escolher a temperatura mais adequada à produção, através de ensaios ao longo do tempo. Estes ensaios serviram também para investigar ao fim de quanto tempo se atingia uma situação de *quasi*-equilíbrio nos sistemas considerados.

Por fim, avaliou-se a estabilidade operacional recorrendo a ensaios com reutilizações sucessivas, para determinar os tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) dos biocatalisadores utilizados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Propriedades físico-químicas e funcionais dos lípidos

Ao grupo dos lípidos pertencem as substâncias que, em geral, são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis ou ligeiramente solúveis em água. Os triacilgliceróis, ésteres formados por uma molécula de glicerol e três ácidos gordos, são os lípidos mais comuns nos alimentos, constituindo mais de 95 % dos óleos e gorduras (Campos, 1998).

Os óleos e gorduras podem ser encontrados em células de origem animal, vegetal ou microbiana. São os maiores componentes do tecido adiposo, e, juntamente com proteínas e glúcidos, constituem os principais componentes estruturais de todas as células vivas (Ribeiro e Seravalli, 2007).

As gorduras exercem funções nutricionais importantes pois são uma fonte de energia (cerca de 9 kcal/g, valor mais elevado do que nos glúcidos e nas proteínas), antioxidantes, ácidos gordos essenciais (ácido linoleico e linolénico), e são responsáveis pelo transporte de vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) para o interior das células. São também responsáveis pelo isolamento térmico e permeabilidade das paredes celulares; contribuem ao nível da textura, de *flavour*, de palatabilidade dos alimentos e também na sensação de saciedade após a refeição (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Os óleos e gorduras possuem diversas aplicações, pois são utilizados para fritar, para conferir as texturas adequadas a produtos de panificação, são excelentes agentes emulsificantes em sistemas alimentares, entre muitas outras utilizações. Como tal, pode-se afirmar que os lípidos têm um papel vital na saúde humana e nos produtos alimentares, por razões sensoriais, nutricionais e funcionais (Ribeiro e Seravalli, 2007).

No entanto, os alimentos ricos em lípidos são muitas vezes rotulados como produtos com efeitos nefastos para a saúde pois a sua ingestão em excesso encontra-se associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, obesidade e alguns tipos de cancro (Ribeiro e Seravalli, 2007).

As características físicas e químicas, o destino metabólico e os benefícios para a saúde que as gorduras proporcionam, são definidos pelo tipo e pela distribuição dos ácidos gordos na molécula de glicerol (Osborn e Akoh, 2002).

Cada molécula de ácido gordo (AG) é constituída por uma cadeia hidrocarbonada de comprimento variável, saturada ou insaturada, ligada a um grupo carboxilo (-COOH). Os ácidos gordos podem ser classificados de acordo com o comprimento da cadeia em: ácidos gordos de cadeia curta, ácidos gordos de cadeia média e ácidos gordos de cadeia longa (Campos, 1998).

Os ácidos gordos de cadeia curta (*Short Chain Fatty Acids*, SCFA), têm entre 2 a 6 átomos de carbono e estão presentes na composição do leite de vaca e na manteiga. Por serem voláteis e hidrossolúveis, possuem baixa massa molecular e reduzido comprimento de cadeia, são mais rapidamente absorvidos no estômago que os outros ácidos gordos. Como tal, são adequados ao

controle da obesidade devido ao seu baixo valor calórico: ácido acético (C2:0), 3,5 kcal/g; ácido butírico (C4:0), 6,0 kcal/g; e ácido capróico (C6:0), com 7,5 kcal/g (Akoh, 1998).

Os ácidos gordos de cadeia média (*Medium Chain Fatty Acids*, MCFA), possuem entre 8 a 12 átomos de carbono. As principais fontes são o óleo de coco e o óleo de palmiste. Durante a digestão são preferencialmente transportados pela veia porta até ao fígado, onde são rapidamente oxidados e disponibilizados imediatamente como energia, não ficando acumulados no tecido adiposo (Bell *et al.*, 1997; Straarup e Hoy, 2000). Estes ácidos gordos podem ser úteis no controlo da obesidade, mas também podem aumentar os níveis de colesterol total (Osborn e Akoh, 2002).

Os ácidos gordos de cadeia longa (*Long Chain Fatty Acids*, LCFA) têm entre 14 a 24 átomos de carbono e são mais comuns em gorduras animais, óleos vegetais e óleos de animais marinhos. Estes ácidos gordos são os mais lentamente absorvidos e metabolizados pelo organismo (Osborn e Akoh, 2002). Os LCFA não conseguem ser absorvidos nem transportados pelo sangue devido ao seu carácter hidrofóbico. São por isso acondicionados em micelas e só depois entram nas células intestinais sob a forma de *quilomicra*. Posteriormente, estes serão segregados pelo sistema linfático para, finalmente, entrarem na circulação sistémica (figura 2.1.) (Willis *et al.*, 1998).

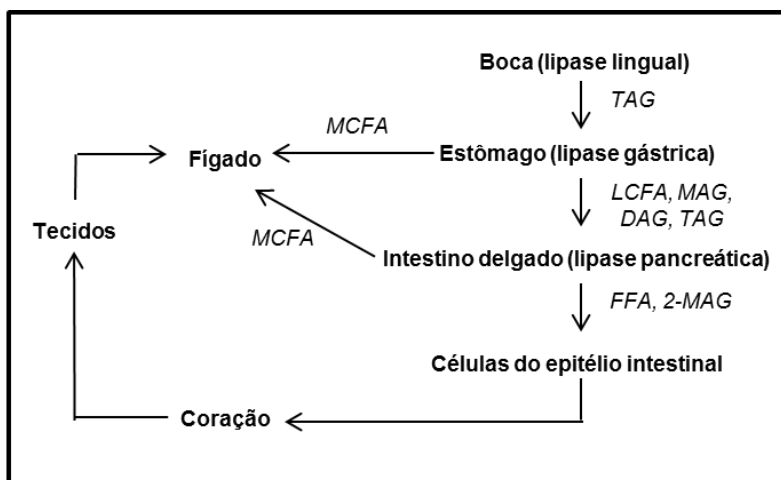


Figura 2.1. – Metabolismo e transporte de triacilgliceróis em crianças e em adultos.  
Fonte: adaptado de Willis *et al.* (1998).

Existem vários tipos de LCFA, entre os quais o ómega-6. O ácido linoleico (C18:2 *n*-6) é um ácido gordo essencial (*Essential Fatty Acid*, EFA) encontrado na maioria dos óleos vegetais e sementes de plantas, como o óleo de grão de bico. Um ácido gordo é considerado essencial quando não é sintetizado pelo organismo humano, apesar de absolutamente necessário para a saúde, pelo que deve ser incluído na dieta alimentar. Por desnaturalização, o ácido linoleico pode dar origem ao ácido araquidónico. Outro EFA é o ácido linolénico (C18:3 *n*-3) que se encontra no óleo de soja e linhaça. Os ácidos gordos ómega-3 têm efeitos benéficos em doentes com

arteriosclerose, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento humano (Willis *et al.*, 1998).

Os ácidos gordos presentes nos lípidos podem ser saturados ou insaturados, de acordo com o número de ligações duplas ou insaturações, que podem variar entre zero e seis. Os ácidos gordos saturados (*Saturated Fatty Acids*, SFA) não possuem ligações duplas e são encontrados na maioria dos óleos e gorduras: são o ácido caprílico (C8:0), o ácido cáprico (C10:0), o ácido láurico (C12:0), o ácido mirístico (C14:0), o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0). Os ácidos gordos insaturados que possuem uma ligação dupla são considerados monoinsaturados (*Monounsaturated Fatty Acids*, MUFA), se apresentarem duas ou mais ligações são considerados polinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*, PUFA). Dos PUFA, destacam-se pelo seu maior interesse o linoleico (C18:2), o linolénico (C18:3), o araquidónico (C20:4), o ácido eicosa-pentenóico (EPA) (C20:5), e o ácido docosa-hexenóico (DHA) (C22:6), que contêm, respetivamente, 2, 3, 4, 5 e 6 ligações duplas. Os MUFA e os PUFA predominam nas plantas superiores, em animais marinhos e em animais que vivem a baixas temperaturas (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Relativamente às características físicas, óleos e gorduras são conceitos distintos. A diferença reside no facto das gorduras se apresentarem na forma sólida e os óleos na forma líquida, à temperatura ambiente de 25 °C. As propriedades físicas dos lípidos são interessantes por constituírem um critério útil para avaliar o estado de processamento ou a utilidade de uma gordura para ser aplicada num determinado produto. Estão diretamente relacionadas com a composição química dos TAG, nomeadamente as que se relacionam com as mudanças de fase (Ribeiro e Seravalli, 2007).

As propriedades físicas mais importantes são o ponto de fusão e o polimorfismo. O ponto de fusão de uma mistura de TAG diferentes é a temperatura à qual se dá a fusão completa. Nos TAG puros, o ponto de fusão é função do (i) comprimento da cadeia (quanto maior o peso molecular, maior o ponto de fusão); (ii) das ramificações (AG com cadeias lineares têm ponto de fusão maior que os AG com ramificações); (iii) do grau de insaturação dos AG constituintes (quanto maior o grau de insaturação, menor o ponto de fusão); e (iv) da sua distribuição ao longo da molécula de glicerol (TAG com distribuição mais simétricas têm maior ponto de fusão). Note-se que as gorduras têm, na sua composição, diferentes TAG, cada um com seu ponto de fusão. Desta forma uma gordura não tem um ponto de fusão definido mas sim uma faixa de temperatura de fusão (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Relativamente ao polimorfismo, as misturas de TAG são líquidas à temperatura de fusão e, quando arrefecidas até à temperatura de solidificação, formam cristais. Os TAG são polimórficos, ou seja, podem existir em vários arranjos cristalinos diferentes, cada um com seu ponto de fusão. A estrutura e as propriedades dos cristais, os quais são produzidos pelo arrefecimento de uma mistura complexa de TAG, são fortemente influenciadas pela velocidade de arrefecimento e temperatura. A aplicabilidade das gorduras e/ou de misturas de gorduras na indústria alimentar depende das características de fusão e cristalização (Ribeiro e Seravalli, 2007).

## 2.2. Os lípidos estruturados

### 2.2.1. Definição e aspetos gerais

Os lípidos estruturados são triacilgliceróis (i) reestruturados por mudança na posição ou no perfil dos ácidos gordos, em relação ao seu estado natural, (ii) modificados pela incorporação de novos ácidos gordos, ou (iii) sintetizados. As suas características dependem da composição e da distribuição dos ácidos gordos no esqueleto de glicerol (posição *sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3). Os lípidos estruturados têm uma grande variedade de propriedades funcionais, nutricionais e organoléticas. O interesse pela produção destes lípidos surge pela capacidade de combinar as características benéficas de diferentes ácidos gordos numa única molécula de triacilglicerol (Akoh, 1998).

Estes lípidos podem ser sintetizados com o propósito de modificação das características físicas (e.g. ponto de fusão, consistência, conteúdo de gordura sólida), químicas (estabilidade oxidativa) e/ou organoléticas dos óleos e gorduras em que se encontram (Haumann, 1994).

Podem ser sintetizados com o objetivo de apresentarem uma composição particular em ácidos gordos, de forma a alcançar determinadas propriedades nutricionais ou funcionais, como por exemplo os TAG dietéticos do tipo MLM de valor calórico reduzido (Osborn e Akoh, 2002).

Além de serem usados na área alimentar, os lípidos estruturados são bastante empregues para fins medicinais e nutracêuticos, em formulações para o tratamento de determinadas doenças ou simplesmente para a manutenção da saúde (Osborn e Akoh, 2002). Como exemplo tem-se a produção de lípidos estruturados ricos em ómega-3 PUFA.

### 2.2.2. Métodos de produção de lípidos estruturados

Os lípidos estruturados são produzidos a partir de triacilgliceróis de cadeia curta, média ou longa, de gorduras de origem animal ou vegetal.

Dependendo do tipo de substrato disponível, pode-se recorrer a diferentes métodos de produção: esterificação, acidólise, alcoólise, ou interesterificação (quadro 1) (Akoh e Lee, 1998).

Os lípidos estruturados podem ser sintetizados por via química (inorgânica) ou por via enzimática (orgânica).

Quadro 1 – Métodos de produção de lípidos estruturados.

Fonte: Akoh e Lee (1998).

<b>Esterificação</b>		
$R_1\text{-CO-OH} + R\text{-OH} \rightarrow R_1\text{-CO-OR} + H_2O$		Ácido + Álcool $\rightarrow$ SL+ Água
<b>Acidólise</b>		
$R_1\text{-CO-OR} + R_2\text{-CO-OH} \rightarrow R_2\text{-CO-OR} + R_1\text{-CO-OH}$		Éster + Ácido $\rightarrow$ SL+ Ácido
<b>Alcoólise</b>		
$R\text{-CO-OR}_1 + R_2\text{-OH} \rightarrow R\text{-CO-OR}_2 + R_1\text{-OH}$		Éster + Álcool $\rightarrow$ SL+ Álcool
<b>Interesterificação</b>		
$R_1\text{-CO-OR}_2 + R_3\text{-CO-OR}_4 \rightarrow R_1\text{-CO-OR}_4 + R_3\text{-CO-OR}_2$		Éster + Éster $\rightarrow$ SL+ SL

No presente trabalho, a produção de lípidos estruturados foi efetuada por acidólise, reação em que os ácidos gordos livres são trocados pelos ácidos que se encontram no éster.

A acidólise enzimática é uma reação reversível e compreende uma hidrólise, seguida de uma esterificação. Os ácidos gordos livres são incorporados nos triacilgliceróis do sistema, até que seja atingido o equilíbrio. Este equilíbrio é função de vários parâmetros, nomeadamente a temperatura de reação, a composição do sistema reacional, o teor de água, a carga da enzima e a presença de inibidores da reação (Xu, 2003).

No que diz respeito à acidólise química, esta tem tido poucas aplicações devido à falta de especificidade posicional, ao contrário da via enzimática. A via enzimática tem mostrado particular importância para produção de produtos de elevado valor acrescentado, como os sucedâneos da gordura de leite humano, cuja síntese foi estudada na presente tese.

A acidólise enzimática também é utilizada quando se pretende incorporar um determinado ácido gordo ou um grupo de ácidos gordos específico, como é o caso do enriquecimento de óleos vegetais e óleos de peixe com quantidades elevadas de EPA e DHA, com o intuito de aumentar as suas propriedades funcionais (Huang e Akoh, 1994).

Outros exemplos especialmente importantes da utilização da acidólise enzimática é a produção de TAG dietéticos do tipo MLM como estudou Nunes (2011), e a produção de HMFS como estudaram Tecelão (2011), Simões (2011), Faustino (2014) e Severino (2014), e como também são estudados no presente trabalho.

#### **2.2.2.1. Síntese química**

Recentemente têm sido realizadas muitas pesquisas no sentido de promover a substituição da interesterificação química pela interesterificação enzimática, devido às vantagens inerentes associadas a este processo. Apesar dos grandes avanços na utilização de lipases como catalisadores da interesterificação, grande parte da indústria ainda depende da interesterificação química. A interesterificação química ocorre sob a influência de um catalisador químico, que provoca a modificação aleatória da posição dos ácidos gordos dentro da molécula de TAG (Marangoni e Rousseau, 1995).

O processo inicia-se com a adição de um catalisador inorgânico à gordura (e.g. metóxido de sódio) e a reação decorre a temperaturas entre 70 e 150 °C, sob pressões reduzidas e condições anidras (Erickson, 1995; Moreno *et al.*, 2004). O catalisador tem a função de promover a libertação dos ácidos gordos das moléculas dos diferentes TAG e ligar-se aos radicais livres que outros ácidos gordos deixaram, no mesmo ou noutro TAG constituinte dessa gordura.

As principais aplicações da síntese química no âmbito dos óleos e gorduras compreendem a modificação das propriedades de fusão e da taxa de plasticidade das gorduras, bem como na produção de TAG de elevado ponto de fusão (Hustedt, 1976; Konish *et al.*, 1993).

Existem diversas vantagens e desvantagens associadas a cada um dos dois tipos de interesterificação. A grande vantagem da interesterificação química sobre a interesterificação

enzimática é uma questão de ordem económica. Os catalisadores químicos têm uma atividade elevada e são economicamente muito mais acessíveis do que as lipases e, mesmo recorrendo a procedimentos de imobilização, o investimento inicial continua a ser demasiado elevado (Rosseau e Marangoni, 2002). Tal facto permite entender que a síntese química de lípidos estruturados é um processo que pode facilmente ser sujeito a um aumento de escala permitindo, desta forma, uma maior viabilidade económica (Willis e Marangoni, 1999).

A síntese química apresenta, no entanto, diversas desvantagens: (i) a acidólise processa-se ao acaso segundo a lei das probabilidades e como tal não permite a formação de lípidos estruturados com ácidos gordos esterificados em posições específicas dos TAG; (ii) o elevado consumo energético devido às altas temperaturas de reação e às pressões reduzidas; (iii) a degradação dos PUFA; (iv) a dificuldade de remoção do catalisador após a reação, e (v) a consequente possibilidade de contaminação química dos produtos finais. Não obstante, devido à falta de especificidade do catalisador, podem ocorrer reações secundárias indesejadas, originando-se produtos secundários, como sabões, MAG e DAG, que têm de ser removidos, aumentando assim os custos de purificação da gordura interesterificada e diminuindo o rendimento da reação. Os catalisadores químicos possuem ainda a desvantagem de serem muito reativos com a água, possibilitando o risco de ocorrência de explosões, mesmo em quantidades de água vestigiais (Erickson, 1995).

Rosseau e Marangoni (1999) referem ainda que a interesterificação química origina grandes alterações nos atributos físicos e sensoriais nos produtos alimentares por eles estudados.

#### **2.2.2.2. Síntese enzimática**

As reações catalisadas por lipases têm atraído o interesse dos investigadores durante a última década, pela diversidade de aplicações e pela importância dos produtos que dela derivam. O uso de lipases tem aplicações em diversas áreas, nomeadamente no campo dos biocombustíveis, especialmente na produção de biodiesel, que é um setor em expansão, como resultado do aumento da demanda mundial pelo uso de energias renováveis (Colla *et al.*, 2010).

O estudo de lipases começou a ser desenvolvido há algumas décadas, e o seu uso na modificação e síntese lipídica apresenta-se muito promissora e viável, devido às potencialidades das lipases e à sua versatilidade como catalisadores de reações (Okumura *et al.*, 1979; Xu, 2003).

As reações catalisadas por lipases caracterizam-se por ocorrerem sob condições suaves; a temperaturas inferiores a 70 °C; à pressão atmosférica; e com seletividade, ao contrário das catalisadas quimicamente (Xu, 2000). Deste modo, a utilização de lipases na síntese de SL poderá constituir algumas vantagens para a indústria alimentar.

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3.) pertencem à classe das hidrolases e atuam na ligação éster, catalisando a hidrólise de gorduras para dar origem a MAG, DAG, ou apenas ácidos gordos livres e glicerol (Campos, 1998). As lipases são enzimas altamente

estáveis, que permanecem ativas mesmo sob condições desfavoráveis. São obtidas maioritariamente de microrganismos naturais ou recombinantes, mas também de animais e plantas, com rendimentos satisfatórios (Akoh, 1995; Pandey *et al.*, 1999).

A utilização de lipases pelas suas características de regio, estereo-seletividade e especificidade, permitem uma estruturação que não é possível por meios químicos (Willis e Marangoni, 2002). Independentemente do meio em que se encontrem, algumas lipases apresentam uma elevada seletividade no que respeita: (i) à classe dos lípidos; (ii) à posição dos ácidos gordos na molécula de glicerol; (iii) às características dos ácidos gordos (nomeadamente o comprimento da cadeia carbonada e o grau de saturação/insaturação); (iv) a um isómero ótico ou ainda, (v) a alguma combinação destas situações (Jensen *et al.*, 1992).

De acordo com a sua especificidade, as lipases podem ser classificadas como: (i) lipases não específicas, quando não apresentam especificidade em relação à posição dos ácidos gordos, atuando nas três posições da molécula de glicerol ou (ii) em lipases com especificidade *sn*-1,3, quando catalisam a libertação dos ácidos gordos apenas nas posições externas da molécula de TAG, originando, por hidrólise, AGL, 1,2 (2,3)-DAG e 2-MAG (Xu, 2000).

Outro aspeto a salientar, é a possibilidade de imobilização das lipases em suportes adequados, de modo a que possam ser utilizadas em reatores contínuos ou reutilizadas em descontínuo (Mateu *et al.*, 2007). A imobilização torna possível a redução do preço das lipases e torna o processo mais viável a nível industrial. Assim, a imobilização tem como principais objetivos: (i) a estabilização do biocatalisador; (ii) a maior facilidade de recuperação do biocatalisador do meio reacional e no controlo do tempo de reação; (iii) a possibilidade de utilização das lipases em sistemas contínuos e reutilização em sistemas descontínuos; (iv) a concentração de grandes quantidades de biocatalisador num pequeno volume de reator para intensificar o processo (Eigtved *et al.*, 1986 citado por Nunes, 2009).

Existem diversos suportes, com características diferentes quanto aos parâmetros que os caracterizam: área superficial, porosidade, tamanho das partículas, compressibilidade, resistência ao atrito e custo. Como exemplos tem-se o carvão ativado, a sílica, as resinas sintéticas, entre muitos outros (Mateu *et al.*, 2007). Para a produção de lípidos estruturados, os suportes a utilizar têm que ser inertes e adequados para uso alimentar.

Quanto às técnicas de imobilização, estas encontram-se em duas categorias: (i) imobilização por ligação a suportes sólidos (por adsorção, ligação covalente ou ligação iónica) ou (ii) imobilização por inclusão (ou confinamento) em matrizes, cápsulas ou microcápsulas. Também é possível a combinação de duas ou mais técnicas (Knežević *et al.*, 2004). Tal como referido anteriormente, todos os materiais e metodologias utilizados na imobilização devem ser adequados para a produção de enzimas imobilizadas com qualidade alimentar.

No entanto, apesar da imobilização, por regra, aumentar a estabilidade operacional da enzima, a sua atividade residual quando imobilizada é, quase sempre, mais fraca que a da respetiva enzima nativa. Este facto deve-se a perdas de atividade causadas durante o procedimento de imobilização e por efeitos de transferência de massa. Ou seja, nem toda a



enzima que é colocada em contacto com o suporte fica imobilizada e, da enzima que se liga ao suporte, parte pode sofrer mudanças na sua conformação, o que poderá alterar a sua eficiência catalítica. No geral, a imobilização em suportes sólidos pode ser vantajosa uma vez que aumenta a área interfacial de contacto enzima-substrato. No entanto, é preciso ter em atenção que durante a imobilização pode existir a possibilidade de inativação da lipase e o risco de se atingirem concentrações inibitórias de substratos e/ou produtos no microambiente (Mateu *et al.*, 2007).

Para além das características de regio, estereo-seletividade e especificidade das lipases, e da necessidade de condições de reação mais suaves, que se traduzem numa poupança de energia, menor produção de resíduos e minimização da degradação térmica (Osborn e Akoh, 2002), a catálise enzimática tem uma outra vantagem: os produtos resultantes desta via podem ser considerados naturais, facto que agrada muito o consumidor atual.

Contudo, o uso de lipases não apresenta exclusivamente vantagens, senão já estariam a ser bastante utilizadas na indústria. As limitações prendem-se com os custos operacionais elevados, taxas de reação lentas, instabilidade, rápida perda da atividade catalítica, impossibilidade de regeneração, variação na qualidade dos produtos, dificuldade de remoção da enzima (quando livre) dos produtos e consequente contaminação dos produtos com resíduos de proteína (Mateu *et al.*, 2007).

À semelhança de qualquer processo enzimático, a utilização de lipases está restringida a uma estreita gama de temperaturas e de valores de pH (quando em meio aquoso). Além disso, a reação pode ser inibida por: elevadas concentrações de substratos e/ou produtos, a enzima pode sofrer inativação por ação de metais pesados e por certos compostos, como produtos de oxidação dos lípidos, ácidos gordos livres, entre outros (Mateu *et al.*, 2007), que serão abordados em seguida.

#### **2.2.2.2.1. Parâmetros que influenciam a atividade e estabilidade enzimáticas**

Quando se trabalha com enzimas deve-se ter em consideração os fatores que afetam a sua atividade e estabilidade operacional. Por estabilidade enzimática entende-se a capacidade que as enzimas têm de reter a sua capacidade ou atividade catalítica, sob diferentes condições de reação ao longo do tempo. O facto de se querer tornar o processo enzimático competitivo é outro dos motivos que leva ao estudo destes parâmetros.

Ao longo do tempo de reação, todas as enzimas perdem gradualmente a sua atividade. A perda de atividade é um processo gradual e natural que afeta todas as enzimas (Rosevear *et al.*, 1987). A velocidade de perda de atividade de uma enzima é caracterizada pelo tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), que é definido como o tempo necessário para que a atividade da enzima seja reduzida a metade do seu valor inicial (Campos, 1998).

A atividade e estabilidade das lipases são influenciadas por diversos fatores, como a temperatura, o pH (quando em meio aquoso), a atividade da água ( $a_w$ ), a pressão, a agitação, a

composição do meio reacional (como concentração do substrato, razão molar entre substratos) e a concentração de enzima, a presença de solventes orgânicos, de agentes oxidantes, e de compostos inibidores da atividade enzimática (como produtos de oxidação lipídica, ácidos gordos livres, pigmentos e íons metálicos) (Correia e Ferreira-Dias, 1998). De seguida encontram-se descritos alguns dos parâmetros que mais afetam a atividade e estabilidade operacional das lipases.

### **Temperatura**

A temperatura é um parâmetro que se deve ter em consideração sempre que se tem como principal objetivo o aumento da velocidade de uma reação enzimática. O aumento da temperatura promove a atividade catalítica das enzimas, mas, a partir de determinado valor, provoca a sua inativação reversível ou irreversivelmente (Campos, 1998).

Nas reações enzimáticas, à medida que a temperatura aumenta, observa-se um efeito conjugado do aumento da velocidade da reação e da aceleração da taxa de desnaturação da enzima (Malcata *et al.*, 1990). Assim, a temperatura a que decorre a reação deve aumentar a uma taxa que compense o decréscimo na atividade enzimática, permitindo ao sistema manter constante a atividade catalítica.

Existe um valor de temperatura ótimo, no qual a velocidade de reação é máxima. Este valor de temperatura é uma característica própria de cada enzima e geralmente situa-se próximo da temperatura normal das células do organismo onde a enzima atua (Campos, 1998).

O aumento da temperatura, para valores superiores à ótima, provoca a diminuição da velocidade de reação. Para valores extremos de temperatura, pode provocar a desnaturação completa e irreversível das lipases. A causa mais comum para inativação a temperaturas elevadas é a perda da conformação original cataliticamente competente (Campos, 1998).

A inativação térmica é um aspeto importante a ter em conta na utilização a longo prazo de lipases, pois a viabilidade económica dos processos industriais de interesterificação enzimática dependem do período de vida útil do biocatalisador. Este, por sua vez, está diretamente relacionado com a temperatura da reação e a termorresistência da enzima (Bailey e Ollis, 1986).

Desta forma, a temperatura de funcionamento de um reator contínuo, onde decorra a interesterificação, deve ser aumentada a uma taxa que compense a diminuição da atividade enzimática, de modo a permitir que o sistema mantenha uma atividade catalítica aproximadamente constante (Malcata *et al.*, 1990). Embora para a maioria das enzimas a termodesnaturação se inicie a 40-50°C (Bailey e Ollis, 1986), existem enzimas termorresistentes que apresentam elevada atividade e estabilidade térmicas. Como exemplo tem-se as preparações comerciais das lipases imobilizadas de *Rhizomucor miehei* e de *Candida Antarctica*, o que as torna adequadas para a modificação de gorduras na ausência de solventes orgânicos (Osório *et al.*, 2001; Simões *et al.*, 2014).

Turner *et al.* (1995) demonstraram que a temperatura a que uma proteína sofre desnaturação térmica está dependente da  $a_w$ . As enzimas que requerem baixa  $a_w$  para a sua atividade catalítica, permanecem ativas a temperaturas elevadas, estando assim protegidas contra a desnaturação.

Mesmo recorrendo a lipases *sn*-1,3 específicas, pode dar-se a migração de grupos acilo no processo global de produção de lípidos estruturados, com consequente formação de TAG indesejáveis, o que exerce um papel importante na deterioração dos SL (Kim e Akoh, 2005). Em geral, uma menor temperatura de reação provoca menores migrações de grupos acilo na estrutura do TAG, favorecendo a formação dos SL desejados (Vikbjerg *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 1998a).

Na produção de substitutos de gordura de leite humano catalisada por lipases (i) por acidólise de banha com ácidos gordos de soja (Yang *et al.*, 2003) e (ii) por interesterificação da tripalmitina com oleato de metilo (Srivastava *et al.*, 2006), a migração de grupos acilo foi favorecida com o aumento da temperatura. Em geral, a migração de grupos acilo ocorre em menor extensão em sistemas contínuos e livres de solvente (Xu *et al.*, 1998b; Moreno *et al.*, 2004; Lopez-Hernandez *et al.*, 2007). O tempo de reação deve ser o mais curto possível, uma vez que as migrações dos grupos acilo durante o processo reacional são proporcionais ao tempo de reação (Xu, 2003).

### **Atividade da água**

A atividade da água ( $a_w$ ) é uma medida da água disponível de um sistema, e corresponde à relação entre a pressão de vapor da água desse sistema ( $P$ ) e a pressão de vapor de água pura no ar saturado à mesma temperatura ( $P_0$ ). A água influencia a manutenção da estrutura da enzima e o seu funcionamento, por participar em todas as interações não covalentes que mantêm a sua conformação nativa e cataliticamente ativa (Campos, 1998).

As lipases possuem uma cinética de ativação interfacial na interface lípido-água, que ocorre devido às características estruturais únicas desta classe de enzimas. Estas, contêm uma unidade constituída por um oligopéptido helicoidal, que protege o centro ativo. Ao interagir com uma interface hidrofóbica (lípidos), esta proteção abre de forma a expor o centro ativo, permitindo o livre acesso ao substrato. Como tal, a remoção total da água duma preparação enzimática provocaria a alteração da conformação da enzima e a sua inativação (Reetz, 2002).

Dependendo da situação, a água pode: (i) encontrar-se em quantidades vestigiais adsorvida às partículas de biocatalisador, verificando-se uma  $a_w$  muito baixa, o que favorece as reações de interesterificação e de esterificação ou (ii) pode constituir uma fase separada da fase orgânica, resultando em valores de  $a_w$  elevados e favorecendo a reação de hidrólise. A  $a_w$  de um sistema determina a hidratação da lipase e, assim, a sua atividade catalítica. Como tal, quando se utilizam lipases imobilizadas para catalisar reações de interesterificação é necessário ter em atenção a  $a_w$  necessária para se obter a atividade máxima. Diferentes enzimas têm diferentes

exigências em relação à  $a_w$  que necessitam para manter um bom nível de atividade catalítica. Um valor elevado de  $a_w$  pode promover uma hidrólise intensa, resultando numa quantidade considerável de DAG, MAG e de AGL, mas com um balanço final de TAG baixo (ou seja, taxa de interesterificação baixa). Uma  $a_w$  reduzida favorece a reação de interesterificação, pelo que proporciona um rendimento final de TAG elevado (ou seja, taxa de interesterificação elevada) (Yamane, 1988).

Dado que o mecanismo de interesterificação catalisada por lipases envolve o processo de hidrólise dos grupos éster nos TAG, seguido de reesterificação (Soumanou *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2003), a otimização da reação resulta do balanço entre as reações de esterificação e as reações de hidrólise. Contudo, a dificuldade no controlo deste processo pode originar o deslocamento da reação no sentido da hidrólise ou da esterificação, no caso de  $a_w$  elevada ou reduzida, respetivamente.

Neste sentido, foram realizados diversos estudos para investigar a influência deste parâmetro na reação de interesterificação. Em geral, as lipases apresentam maior atividade na esterificação e na interesterificação dos lípidos em meios de  $a_w$  entre 0,2 e 0,5 ou mesmo em meios quase isentos de água ( $a_w$  de 0,064 a 0,11), dependendo do biocatalisador utilizado e das condições da reação (Bloomer *et al.*, 1992; Svensson *et al.*, 1992; Ferreira-Dias e da Fonseca, 1995; Osório *et al.*, 2001; Adlercreutz *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2004; Petersson *et al.*, 2007). Contudo, algumas lipases apresentaram o seu máximo de atividade na interesterificação a valores de  $a_w$  superiores a 0,5 e, em alguns casos, a valores de  $a_w$  próximos de 1, onde seria de esperar que ocorresse apenas a reação de hidrólise (Faustino, 2014; Severino, 2014).

### ***Produtos de oxidação dos lípidos***

Os lípidos estão sujeitos a reações de auto-oxidação, induzidas pela presença de oxigénio, durante o seu acondicionamento e manuseamento à temperatura ambiente. Trata-se de um processo lento, que só ocorre até determinado grau.

Algumas gorduras são mais suscetíveis à oxidação que outras, consoante (i) o grau de insaturação (quanto mais insaturada for a gordura, maior a sua suscetibilidade à oxidação), (ii) a presença de antioxidantes, (iii) a presença de pró-oxidantes, como os metais (e.g. ferro e cobre) e (iv) outros fatores, como a exposição à luz e ao calor.

A oxidação dos lípidos nos alimentos origina “off-flavours”, designadamente o odor a ranço. O que acontece é a reação do oxigénio com os ácidos gordos insaturados, ao nível das duplas ligações, que funcionam como o centro ativo no qual se inicia a reação de oxidação. O resultado é a formação dos produtos iniciais da oxidação, os hidroperóxidos. Com o decorrer da reação, os hidroperóxidos vão reagir facilmente com os ácidos gordos e originar os produtos secundários da oxidação: aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos gordos de cadeia curta. Consecutivamente, a atividade e estabilidade das lipases diminuem, principalmente, devido aos hidroperóxidos (Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998a). Deste modo, a utilização de

gorduras polinsaturadas pode conduzir a uma diminuição da atividade e da estabilidade operacional das lipases quando utilizadas em reatores contínuos (Osório *et al.*, 2006).

O principal desafio na incorporação de TAG enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados em produtos alimentares é manter a estabilidade oxidativa controlada. Assim, não ocorre o desenvolvimento dos “off-flavours” durante a produção e armazenamento do produto, que mantém características sensoriais aceitáveis (Ferreira-Dias, 2010).

Quando se pretende evitar ou retardar a oxidação dos lípidos, recorre-se, normalmente: (i) à remoção do oxigénio, (ii) à utilização de um gás inerte no espaço de cabeça dos depósitos, (iii) à adição de antioxidantes ou (iv) ao uso combinado de alguns destes métodos. Outro aspeto a ter em atenção é o uso de temperaturas elevadas durante o processamento e armazenamento.

### **Ácidos gordos livres**

A hidrólise dos óleos e gorduras, tanto de origem enzimática como química, conduz ao aparecimento de glicerol, AGL, MAG e DAG, em quantidades variáveis, consoante a hidrólise seja parcial ou completa. A formação de ácidos gordos livres leva imediatamente a uma alteração das características organoléticas do produto.

A reação de hidrólise pode prosseguir, desde que exista água no meio reacional. Com o aumento do número de ácidos gordos livres, o pH do meio vai diminuir. Dado que cada enzima tem um pH ótimo ou uma faixa de pH ótimo de atividade, onde a sua atividade é máxima, grandes alterações no pH podem provocar alterações no estado de ionização dos resíduos de aminoácidos da enzima. Por sua vez, se estas alterações provocarem uma repulsão de cargas, ocorre a perda completa da atividade da enzima (Campos, 1998).

A presença de elevados teores de ácidos gordos livres pode estar na origem da inativação/inibição das lipases (Tcelão *et al.*, 2012; Casas-Godoy *et al.*, 2013). Nas reações de acidólise, este aspeto limita a utilização de substratos com elevadas concentrações de ácidos gordos livres. Assim, o efeito inibitório conferido pelos ácidos gordos livres é uma das razões que têm limitado a aplicação prática das lipases em alguns sistemas (Dünhaupt *et al.*, 1992).

No entanto, existem estudos que demonstram que os teores de ácidos gordos livres existentes nos meios reacionais sujeitos a interesterificação, parecem não ter qualquer efeito negativo na estabilidade da enzima (Holm e Cowan, 2008).

#### **2.2.2.2.2. Produção de sucedâneos da gordura de leite humano**

O leite humano consiste numa emulsão de óleo em água, constituída aproximadamente por 87 % de água e por uma fração rica em gordura, minerais, vitaminas, enzimas e imunoglobulinas, em que a fração lipídica corresponde entre 3 a 5 % da emulsão (Jensen *et al.*, 1992; Da Silva *et al.*, 2007).

A fração lipídica do leite humano é composta por cerca de 98 % de TAG, 1,3 % de fosfolípidos e 0,4 % de colesterol (Jensen, 1989). Os ácidos gordos presentes nos TAG são maioritariamente de cadeia longa, nomeadamente ácido oleico e ácido palmítico, que por si só contribuem para quase 70 % do total de ácidos gordos presentes no leite humano (Pande *et al.*, 2013).

No fabrico da fração lipídica das formulações de leite para bebés utiliza-se frequentemente óleos vegetais ou leites de animais como substitutos da gordura do leite humano. A composição e a distribuição dos ácidos gordos destas formulações tem sido uma área de desenvolvimento crescente na indústria alimentar, pois procura-se imitar cada vez mais e melhor a estrutura e composição da gordura do leite humano (Sahín *et al.*, 2005). O principal objetivo é respeitar a distribuição dos ácidos gordos na molécula de glicerol, a estrutura ISI (insaturado-saturado-insaturado), característica da gordura de leite humano. Nela, os ácidos gordos insaturados ocupam as posições externas e os ácidos gordos saturados a posição interna dos triacilgliceróis. Nos óleos e gorduras de origem vegetal ou animal, ao contrário do que é observado no leite humano, o ácido palmítico e os restantes ácidos gordos saturados encontram-se predominantemente esterificados nas posições externas das moléculas dos triacilgliceróis (Picciano, 1998) (figura 2.2.).

Durante a síntese de HMFS por acidólise, os ácidos gordos saturados são libertados como ácidos gordos livres, por ação da lipase pancreática *sn*-1,3 seletiva. O problema reside no facto do ácido palmítico na forma não esterificada facilmente originar sabões insolúveis ao reagir com o cálcio ou outros catiões bivalentes o que implica problemas de obstipação no recém-nascido. Assim, esta pequena modificação em relação à estrutura dos triacilgliceróis existentes na gordura de leite humano, traduz-se numa deficiente absorção de ácido palmítico, cálcio e outros minerais por parte do recém-nascido (Pande *et al.*, 2013).

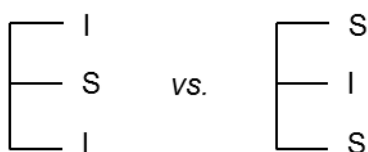


Figura 2.2. – Estrutura dos principais triacilgliceróis da gordura de leite humano vs. estrutura dos principais triacilgliceróis de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal (S – Ácido gordo saturado e I – Ácido gordo insaturado).

Os estudos realizados sobre a síntese de HMFS descrevem a utilização de sistemas reacionais, em presença ou ausência de solvente orgânico, cuja composição obedece, na sua maioria, a um padrão característico: todos referem (i) uma fonte de ácido palmítico, (ii) lipases imobilizadas com seletividade *sn*-1,3 como biocatalisador e (iii) uma fonte de ácidos gordos, estejam livres ou esterificados ao esqueleto de glicerol (Tecelão, 2011; Simões 2011; Faustino, 2014).

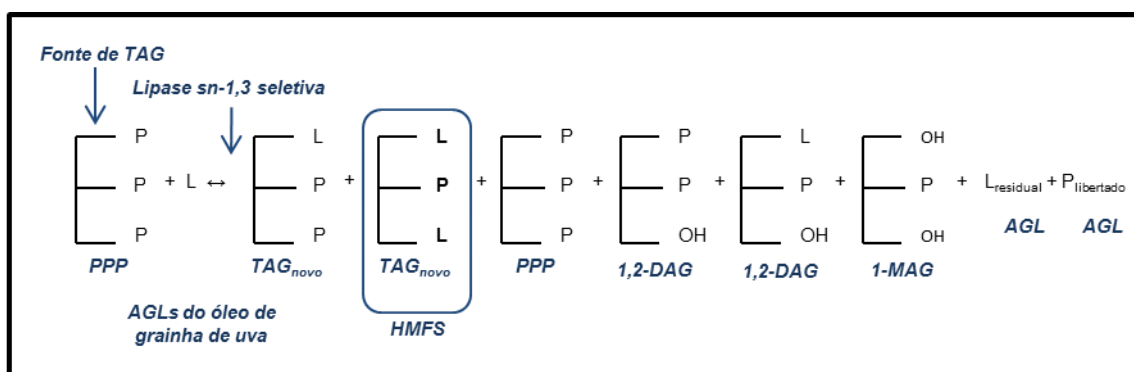


Figura 2.3. – Esquema representativo da reação de produção de HMFS por acidólise entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres do óleo de graminha de uva, catalisada por uma lipase *sn*-1,3 seletiva.

Na síntese de HMFS realizada no presente trabalho, foram utilizados, como fonte de ácido palmítico a tripalmitina; como fonte de ácidos gordos livres o óleo de graminha de uva; e como lipases imobilizadas *sn*-1,3 seletivas, a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Amberlite™ IRA96 e a lipase de *Carica papaya* auto-imobilizada no látex (figura 2.3.).

Atualmente existe o Betapol™, da Lipid Nutrition (Holanda), projetado para ser utilizado em fórmulas para latentes. Este produto consiste num triacilglicerol fundamentalmente do tipo OPO (ácido oleico nas posições externas e ácido palmítico na posição interna) obtido por interesterificação de gorduras vegetais ricas em ácido palmítico na posição *sn*-2, catalisada por uma lipase *sn*-1,3 específica (<http://www.betapol.com/en/why-is-betapol-the-best-alternative>) (figura 2.4.).

Mais recentemente, surgiu o InFat™, produzido de forma muito semelhante ao Betapol™ mas fabricado pela Advanced Lipids (<http://www.advancedlipids.com/infat.html>). Tanto o Betapol™ como o InFat™ são produtos comerciais usados como HMFS em leites para bebés.

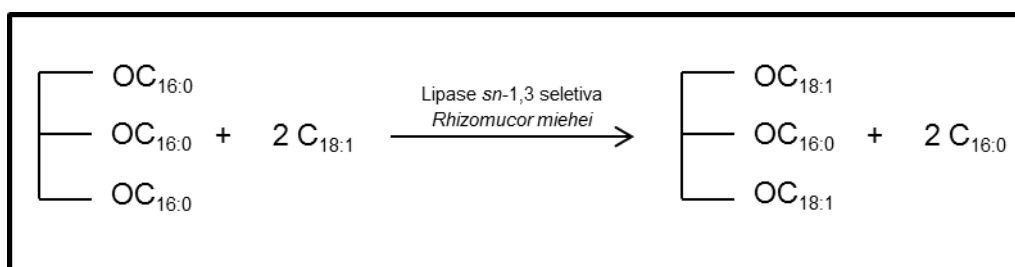


Figura 2.4. – Representação esquemática da síntese de “Betapol” por acidólise entre tripalmitina e ácido oleico, catalisada pela lipase *sn*-1,3 específica de *Rhizomucor miehei*.

Fonte: <http://www.betapol.com/en/why-is-betapol-the-best-alternative>

Apesar das inúmeras pesquisas envolvendo diversos processos e substratos, o objetivo de desenvolver lipídios estruturados semelhantes à gordura do leite humano ainda está distante de ser totalmente alcançado. Exemplo disso é o facto das formulações atuais não apresentarem as quantidades necessárias de DHA e EPA, que são os principais ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (Gamboa e Gioielli, 2006). Assim, o desafio atual consiste em incorporar EPA e DHA, provenientes, por exemplo, de óleos marinhos, nas posições externas dos TAG por acidólise.

Devem também ser conduzidas mais pesquisas para avaliar o desempenho dos lípidos estruturados produzidos nos recém-nascidos.

### 2.2.2.2.3. Produção de triacilgliceróis dietéticos

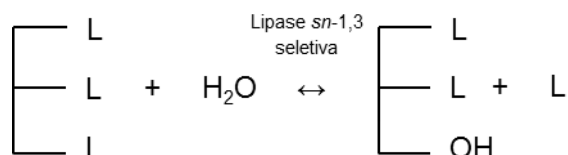
Os lípidos estruturados dietéticos do tipo MLM são ricos em ácidos gordos polinsaturados na posição interna e ácidos gordos de cadeia média (M) nas posições externas do TAG.

O objetivo que se pretende atingir com a produção deste tipo de lípidos é prevenção da obesidade e auxiliar pessoas com problemas digestivos, dado que a posição dos ácidos gordos revela um impacto significativo no metabolismo humano (Hamam e Shahidi, 2008). Ao conter em simultâneo ácidos gordos de cadeia média e ácidos gordos polinsaturados, podem funcionar como lípidos terapêuticos, úteis em nutrição entérica (alimentação feita através de tubo digestivo) e parentérica (alimentação intravenosa). Os ácidos gordos de cadeia média apresentam uma baixa tendência para se acumularem nos tecidos adiposos, com benefícios claros no controlo da obesidade. Assim, a ingestão destes lípidos estruturados fornece ácidos gordos essenciais de cadeia longa e permite, simultaneamente, a libertação mais lenta e controlada de ácidos gordos de cadeia média na corrente sanguínea (Babayan, 1987). Neste contexto, os triacilgliceróis do tipo MLM apresentam interesse dietético pelo seu menor valor calórico (5-7 kcal/g) comparativamente aos óleos e gorduras convencionais (9 kcal/g) (Xu, 2000).

A síntese de TAG do tipo MLM ocorre por acidólise entre um TAG constituído por três ácidos gordos de cadeia longa, do tipo LLL (Long-Long-Long), e ácidos gordos de cadeia média. Esta reação ocorre em duas fases, ambas catalisadas por lipases *sn*-1,3 seletivas: uma primeira fase de hidrólise dos TAG seguido de uma fase de esterificação dos diacilgliceróis (DAG) formados com os AGL (Xu, 2003).

A síntese de TAG do tipo MLM a partir de TAG do tipo LLL e de ácidos gordos livres de cadeia média envolve as seguintes reações:

1) Hidrólise dos TAG do tipo LLL que origina a formação de DAG (LL-OH) e AGL de cadeia longa (L):

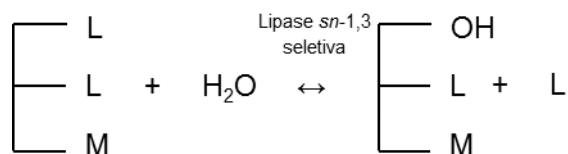


2) Esterificação dos DAG (LL-OH) com os AGL de cadeia média e formação de TAG mono-substituídos (LLM):





3) Hidrólise dos TAG mono-substituídos (LLM) que origina DAG (OH-LM) e AGL de cadeia longa (L):



4) Esterificação dos DAG (OH-LM) com os AGL de cadeia média e formação de TAG do tipo MLM:



De forma a clarificar a complexidade da produção de TAG dietéticos do tipo MLM realizados na presente tese, a partir de óleo de grainha de uva e de ácido cáprico ou caprílico, foi elaborado o esquema da figura 2.5.. Neste esquema, admite-se que o ácido gordo livre maioritário do óleo de grainha de uva é a trilinoleína (LLL), constituindo este facto por si só já uma aproximação do que acontece na realidade. Assim, tem-se a LLL a reagir com os ácidos gordos de cadeia média (C8:0 ou C10:0, no caso da figura 2.5. está representado o C8:0) e, por ação de uma lipase *sn*-1,3 seletiva (rROL ou CPL), a libertar AGL e a originar monoacilgliceróis (MAG), DAG e TAG novos.

A produção de lípidos estruturados do tipo MLM, catalisada por lipases imobilizadas, tem sido estudada ao longo dos últimos anos por muitos investigadores, tanto em presença como em ausência de solvente (Sellapan e Akoh, 2001; Fomuso e Akoh, 2002; Kawashima *et al.*, 2002; Nagao *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2004; Öztürk *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2011).

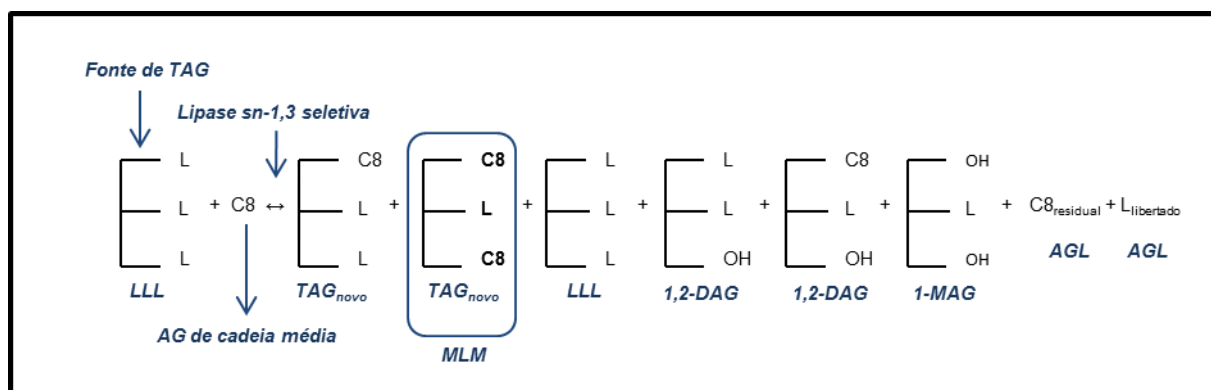


Figura 2.5. – Esquema representativo da reação de produção de MLM por acidólise entre óleo de grainha de uva e ácido caprílico, catalisada por uma lipase *sn*-1,3 seletiva.

Sellapan e Akoh (2001) produziram lípidos estruturados por acidólise da trilinoleína com o ácido caprílico e o ácido esteárico, em *n*-hexano, catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei*. O produto final apresentou propriedades físicas adequadas à incorporação em óleos e molhos para temperar.

Fomuso e Akoh (2002) enriqueceram os TAG do azeite nas posições externas com ácido caprílico (43 mol-%), por acidólise catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei*, e mantiveram os benefícios do ácido oleico na posição interna do TAG.

Moreno *et al.* (2004) sintetizaram TAG dietéticos do tipo MLM por acidólise entre um TAG rico em ácido eicosapentenóico na posição interna e ácido caprílico nas posições externas, catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei*.

A produção de lípidos estruturados tem sido catalisada por outras lipases, como a lipase de *Rhizopus oryzae*. Kawashima *et al.* (2002) e Nagao *et al.* (2003) utilizaram esta lipase na síntese de TAG do tipo MLM por acidólise de óleos ricos em ácido gama-linolénico ou em ácido araquidónico e ácido caprílico. Nunes *et al.* (2011) também utilizaram a mesma lipase na produção de TAG do tipo MLM por acidólise entre azeite virgem extra e ácido caprílico ou ácido cáprico.

Öztürk *et al.* (2010) otimizaram a acidólise entre o óleo de milho e o ácido caprílico, pela ação da lipase de *Thermomyces lanuginosa*, em presença de *n*-hexano, permitindo a incorporação de ácido caprílico em TAG do tipo MLM.

A maioria dos lípidos estruturados com funções dietéticas existentes no mercado são produzidos por interesterificação química, como é o caso de Structolipid™, produzido pela *Pharmacia & Upjohn AB* (Suécia), é composto por uma mistura de TAG de cadeia média (provenientes de óleo de coco ou de óleo de palmiste) e TAG cadeia longa (provenientes de óleo de soja refinado) (Rubin *et al.*, 2000). Outro exemplo é Caprenin™, produzido pela *Procter & Gamble* (E.U.A.), é constituído por ácido caprílico, ácido cáprico e ácido beénico (Webb e Sanders, 1991). Estes lípidos dietéticos são produzidos por via química, e, como tal, os ácidos gordos estão aleatoriamente distribuídos na molécula de TAG.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Biocatalisadores e suportes de imobilização

Os biocatalisadores utilizados foram ambos lipases não comerciais, nomeadamente a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* (rROL) e a lipase de *Carica papaya* (CPL).

A lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* foi produzida por cultivo em fed-batch da levedura metilotrófica da estirpe *Pichia pastoris*. Esta lipase foi produzida de acordo com o procedimento descrito por Arnau *et al.* (2010), pelo grupo do Professor Francisco Valero da Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha. Posteriormente, a enzima foi imobilizada no suporte Amberlite™ IRA96 (c.f. 3.2.2.), proveniente da Rhom and Haas, Philadelphia, USA.

A Amberlite™ IRA96 é uma resina aniónica de base fraca, constituída por uma matriz de copolímero de divinilbenzeno e estireno e apresenta-se sob a forma de pequenos grânulos esféricos opacos de cor amarelada. As principais propriedades físicas e químicas características desta resina são a dimensão média dos grânulos entre 0,55 e 0,750 mm, o grupo funcional a amina terciária (mínimo de 85%), e a capacidade de retenção de água entre 57 e 63 %. É uma resina de longa duração, com boa capacidade operacional e excelente estabilidade física e osmótica. É muito utilizada na desmineralização de água industrial, mas também é adequada à imobilização de lipases (<http://www.lenntech.com/Data-sheets/Amberlite-IRA-96-L.pdf>).

A lipase de *Carica papaya* está naturalmente auto-imobilizada no látex e foi extraída de agro-resíduos de plantações de papaia (Tecelão *et al.*, 2012), pelo grupo da doutora Georgina Sandoval, do Centro de Investigação e Assistência em Tecnologia e Desenho do Estado de Jalisco, Guadalajara, México. A CPL constitui uma alternativa de baixo custo às lipases comerciais, pois os seus extratos mais ativos são recolhidos de plantas verdes ou doentes, com elevados níveis de enzimas de defesa (Domínguez de María *et al.*, 2006).

##### 3.1.2. Substratos

- **Fonte de triacilgliceróis**

Utilizou-se a tripalmitina ( $C_{51}H_{98}O_6$ ; MM 807,32 g mol<sup>-1</sup>) com grau de pureza superior ou igual a 85 %, da TCI Europe N.V., como fonte de ácido palmítico para os ensaios de produção de HMFS.

Utilizou-se o óleo de grainha de uva refinado, da Smile Noël, Pont-Saint-Esprit, França, como fonte de ácido linoleico para os ensaios de produção de HMFS e de MLM.

O quadro 2 descreve a composição em ácidos gordos do óleo de grainha de uva refinado, determinado por cromatografia gasosa capilar.

Quadro 2 – Composição em ácidos gordos do óleo de gralha de uva (% molar).  
Fonte: Severino (2014).

	Ácido gordo	% molar
Saturados	C14:0	< 0,01
	C15:0	0,01
	C16:0	7,73
	C17:0	0,07
	C18:0	4,69
	C20:0	0,23
	C21:0	0,10
	C22:0	0,07
	C24:0	0,09
Monoinsaturados	C16:1	0,12
	C17:1	0,03
	C18:1	1,22
	C20:1	0,24
Polinsaturados	C18:2	84,96
	C18:3	0,39
	C20:2	0,04

#### • Ácidos gordos livres de cadeia média

Como ácidos gordos livres de cadeia média, utilizaram-se o ácido caprílico ( $C_8H_{16}O_2$ ; MM 144,21 g mol<sup>-1</sup>) e o ácido cáprico ( $C_{10}H_{20}O_2$ ; MM 172,26 g mol<sup>-1</sup>) e ambos com grau de pureza superior ou igual a 98%, da TCI Europe N.V., Bélgica.

#### 3.1.3. Reagentes e outros materiais

Os principais reagentes e materiais de laboratório utilizados para a execução do presente trabalho prático foram os seguintes:

- 2'7'-diclorofluoresceína, da Fluka;
- Acetona *p.a.*, da Fischer Scientific;
- Ácido acético *p.a.*, da Fischer Scientific;
- Ácido clorídrico 37 %, da Sigma-Aldrich;
- Albumina bovina (≥ 96 %), da Sigma-Aldrich;
- Clorofórmio *p.a.*, da Fischer Scientific;
- Coomassie-Brilliant Blue G, (≥ 90 %), da Sigma-Aldrich;
- Etanol 96 % (v/v), da Panreac Química S.L.U.;
- Glutaraldeído 25 p/p, da Merck;
- Hidróxido de sódio *p.a.*, da Fischer Scientific;
- Monodecanoína (99 %), da Larodan AB;

- *n*-Heptano *p.a.*, da Fischer Scientific;
- *n*-Hexano 95 % (v/v), Fischer Scientific;
- N-metil-N-trimetil-silil-trifluoroacetamida – MSTFA (> 90 %), da TCI Europe N.V.;
- Piridina *p.a.*, da Panreac Química S.L.U.;
- Sulfato de sódio anidro, da Panreac Química S.L.U.;
- Papel de filtro, Ø 125 mm, Cat. No 1001 125, da Whatman™;
- Placas de sílica-gel 60, de dimensões 20x20 cm e 0,25 mm de espessura, da Merck.

Os restantes reagentes utilizados foram de grau de pureza *pro analysis*, obtidos de diferentes fontes.

### 3.1.4. Equipamentos

Os principais equipamentos e utensílios de laboratório utilizados para a execução do presente trabalho prático foram os seguintes:

- Balança de precisão (máximo 183 g), modelo 870 da Kern;
- Cromatógrafo gasoso capilar, Agilent Technologies 7820A, com injetor on-column da Agilent Technologies, equipado de uma coluna DB-5ht com 15 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de filme e de um detetor de ionização de chama;
- Exsicador da Duran;
- Estufa de secagem, RT 360, da Heraeus,  $T_{\text{máx}} = 220\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Placas de agitação magnética das marcas Variomag Compact e Velp Scientifica;
- Placa de agitação magnética com aquecimento, da Velp Scientifica;
- Reatores de vidro de parede dupla, com cerca de 25 cm<sup>3</sup> de volume;
- Cabeça termostática da Julabo ED;
- Bomba de vácuo para filtração, modelo RTE-200, da Neslab;
- Tina cromatográfica de vidro, 22x20x10 cm;
- Ultraturrax T25 Basic da IKA Labortechnik;
- Vortex da Velp Scientifica;
- Espectrofotómetro UV/Visível UV4 da UNICAM.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Preparação dos ácidos gordos livres

A preparação dos ácidos gordos livres de óleo de gralha de uva foi realizada de acordo com o método descrito por Sahín *et al.* (2005), com algumas modificações.

Saponificaram-se 25 g de óleo de gralha de uva utilizando uma mistura de 5,75 g de KOH, 11 mL de água destilada e 66 mL de solução aquosa de etanol a 96 % (v/v), em refluxo, num banho de água a 100 °C, durante 1 hora.

Em seguida foram adicionados 50 mL de água destilada à mistura saponificada, para depois ser transferida para uma ampola de decantação. A fração insaponificável foi extraída com duas lavagens de 100 mL de *n*-hexano e desprezada. A fase aquosa foi acidificada com uma solução de HCl 3N até se atingir valor de pH 1.

Para se proceder à extração dos ácidos gordos livres, adicionaram-se 50 mL de *n*-hexano à solução acidificada. A remoção da água foi realizada adicionando-se sulfato de sódio anidro e filtrando-se esta solução com recurso a papel de filtro. A solução foi transferida para um balão de vidro periforme que foi colocado num evaporador rotativo a 40 °C e a uma pressão inferior a 100 mbar, para se evaporar o *n*-hexano.

A solução obtida, contendo os ácidos gordos livres, foi guardada num frasco de vidro escuro e armazenada a -18 °C até ao momento da sua utilização.

A eficiência do processo de saponificação foi comprovada através da técnica de cromatografia em camada fina, que será explicada em seguida.

#### **Cromatografia em camada fina**

A técnica de cromatografia em camada fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) utilizada neste trabalho, foi realizada de acordo com o método descrito por Sahín *et al.* (2005), com algumas modificações.

Dissolveram-se 0,06 g de óleo de gralha de uva saponificado em 10 mL de clorofórmio *p.a.* num balão volumétrico, agitando bem. A aplicação da amostra foi efetuada com o auxílio de uma agulha, depositando 200 µL em banda contínua numa placa de TLC de sílica gel, a 1,5 cm de distância à base da placa e a 3 cm das laterais.

A placa foi colocada em posição vertical dentro de uma tina cromatográfica de vidro tapada e ao abrigo da luz, contendo o eluente da TLC (fase móvel), constituído por 70 mL de *n*-hexano, 30 mL de éter etílico e 1,5 mL de ácido acético.

Cerca de uma hora depois, o eluente ascendeu até cerca de 1,5 cm do topo da placa por capilaridade. Esta separação é conseguida devido aos diferentes grupos de compostos que percorreram a placa de TLC, a velocidades distintas, consoante a maior ou menor afinidade para a fase estacionária. Nesse momento, a placa foi removida da tina e após evaporação do

solvente, foi pulverizada com solução reveladora de 2,7-diclorofluoresceína, para permitir a visualização das bandas de ácidos gordos sob luz UV, a 366 nm (figura 3.1.).

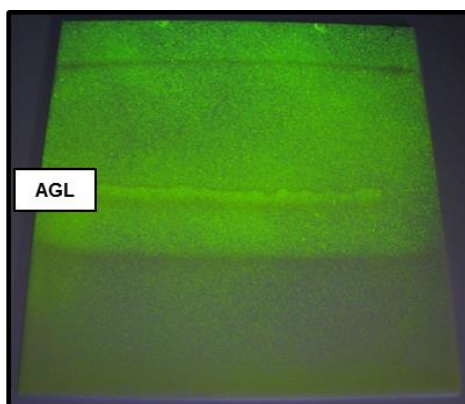


Figura 3.1. – Exemplo de uma placa de TLC de sílica gel, sendo visível a banda dos ácidos gordos livres.

### 3.2.2. Imobilização da lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae*

Dos dois biocatalisadores não comerciais testados na presente tese, apenas a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* foi fornecida na forma livre. A lipase de *Carica papaya* está naturalmente auto-imobilizada no látex da papaia.

A metodologia utilizada para a imobilização da rROL em Amberlite™ IRA96 baseia-se no método descrito por Wang *et al.* (2010), com algumas modificações. A carga de enzima imobilizada definida foi de 25 % (m/m).

Inicialmente, adicionaram-se 5 g da resina aniônica Amberlite™ IRA96 a 50 mL de água desionizada, sob agitação magnética suave, durante 30 minutos, a 50 °C. De seguida, fizeram-se três lavagens sucessivas do suporte, alternadamente, com 25 mL de solução aquosa de NaOH 1M e 25 mL de solução aquosa de HCl 1M.

No fim, o suporte foi imerso em 100 mL de solução de tampão de fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,5). Para a elaboração da solução tampão de fosfato, preparou-se uma solução A (1/15 M; dissolveram-se 9,073 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 1000 mL de água destilada) e uma solução B (1/15 M; dissolveram-se 11,87 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 1000 mL de água destilada). De seguida, transferiram-se 12,8 mL da solução A para um balão volumétrico de 100 mL, perfazendo o volume com solução B. O pH da solução foi medido no potenciômetro e acertado até pH 7,5. Depois o suporte foi colocado a secar durante 24h no excicador.

Para cada 1 g de resina resultante adicionou-se 0,25 g de lipase dissolvida em 10 mL de solução tampão de fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,5). O sistema foi colocado a 28 °C, sob agitação magnética suave, durante 4 horas.

Após este período, as partículas foram recuperadas por filtração sob pressão reduzida e postas em contacto com uma solução aquosa de glutaraldeído 0,5 % (v/v) (25 mL/1 g de suporte) e, em seguida, lavadas três vezes com 15 mL de solução tampão de fosfato de sódio.

A adição de glutaraldeído tem o objetivo de fortalecer a ligação enzima suporte, evitando que ocorra a libertação da enzima imobilizada para o meio reacional, durante a sua utilização. Ou seja, o glutaraldeído vai impedir a reversibilidade do processo de imobilização enzimática, ao formar uma rede ou malha reticular que envolve as enzimas (Migneault *et al.*, 2004).

Por fim, a enzima imobilizada foi seca num exsiccador e armazenada a -18 °C até ao momento da sua utilização.

### **Análise de proteína**

O teor de proteína foi determinado de acordo com o método descrito por Bradford (1976), com algumas modificações, utilizando-se como padrão a albumina bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA).

Inicialmente preparou-se uma solução com 1 mg/mL de BSA dissolvendo-se 0,01 g de albumina bovina em 10 mL de solução tampão de fosfato (0,1 M; pH 7,0). A solução tampão de fosfato foi preparada adicionando-se à solução C (2,00 g de NaOH para 500 mL de água destilada) pequenos volumes de solução D (6,80 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 500 mL de água destilada) até se ajustar pH = 7,0.

De seguida prepararam-se seis tubos de ensaio com as soluções de diferentes concentrações de BSA descritas no quadro 3, para traçado da curva de calibração.

Quadro 3 – Soluções utilizadas para traçado da curva de calibração para a albumina bovina.

Tubo	[Proteína] (mg/mL)	Solução de BSA ( $\mu\text{L}$ )	Tampão ( $\mu\text{L}$ )	Volume total ( $\mu\text{L}$ )
1	0	0	100	100
2	0,2	20	80	100
3	0,4	40	60	100
4	0,6	60	40	100
5	0,8	80	20	100
6	1,0	100	0	100

A cada um dos tubos foram adicionados volumes de solução de tampão de fosfato (0,1 M; pH 7,0) até perfazer 100 mL, e 5 mL de reagente de Bradford, homogeneizando muito bem as soluções no vórtex.

Para elaborar o reagente de Bradford, dissolveram-se 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue G 250 ( $\text{MM} = 854,04 \text{ g/mol}$ ) em 50 mL de etanol 96 % (v/v), e adicionaram-se 100 mL de ácido (orto) fosfórico. A solução preparada foi colocada num balão volumétrico de 1 L que se perfez com água desionizada. Por fim, filtrou-se a solução e guardou-se num frasco de vidro escuro.



Seguiu-se um tempo de espera de 15 minutos e em seguida leu-se a absorvância das amostras no espectrofotômetro a 595 nm.

Com os valores de absorvância obtidos da leitura no espectrofotômetro, de cada uma das soluções preparadas nos tubos, traçou-se a curva padrão para doseamento de proteína expressa em albumina bovina (figura 3.2).

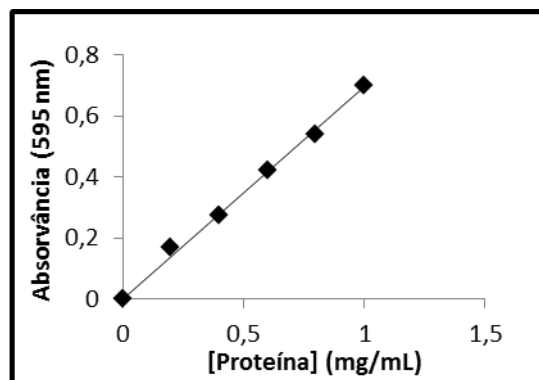


Figura 3.2. – Curva de calibração obtida para o padrão de BSA.

As amostras a analisar, relativamente ao seu teor em proteína, foram recolhidas nas diferentes fases de imobilização da rROL em Amberlite™ IRA96. Neste caso, foi analisada uma amostra da solução enzimática inicial e uma amostra do primeiro filtrado, recolhido antes da adição da solução de glutaraldeído.

Assim, prepararam-se 3 tubos de ensaio contendo, respetivamente:

- 0,1 mL de solução enzimática e 5 mL de reagente de Bradford;
- 0,1 mL do primeiro filtrado e 5 mL de reagente de Bradford;
- 0,1 mL de solução tampão e 5 mL de reagente de Bradford (branco).

O procedimento foi idêntico ao seguido para o traçado da curva padrão.

O rendimento de imobilização ( $\eta$ ) foi calculado por quantificação do teor de proteína presente na solução inicial, ou seja, antes da adição do suporte de imobilização, ( $P_0$ ), e a quantidade de proteína residual presente no primeiro filtrado, após a imobilização, ( $P_1$ ), de acordo com a seguinte equação:

$$\eta = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

### **Atividade hidrolítica**

A avaliação da atividade hidrolítica foi realizada para a solução enzimática inicial, para a enzima imobilizada e para o primeiro e segundo filtrado, de acordo com o método de Soares *et al.* (1999), com algumas modificações.

Dissolveram-se 3,5 g de goma arábica em 50 mL de água destilada sob agitação magnética durante 10 minutos. De seguida adicionaram-se 50 g de azeite virgem extra, 80 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7), e homogeneizou-se a emulsão no ultraturrax.

Colocaram-se 9 mL da emulsão anteriormente preparada em reatores cilíndricos de vidro de parede dupla, mantidos a 30 °C por um banho termostatizado, sob agitação magnética.

Após cerca de 10 minutos em agitação, adicionaram-se 0,3 g de enzima imobilizada ou 1 mL de solução enzimática inicial ou 5 mL do primeiro filtrado ou do segundo filtrado. A hidrólise decorreu, para a enzima imobilizada e para a solução enzimática inicial, durante 5 minutos, e durante 10 minutos para os filtrados.

Para parar a reação de hidrólise no fim do período estipulado, foram adicionados, a cada reator, 20 mL de solução acetona:etanol (1:1, v/v).

A quantidade de ácidos gordos livres libertados durante a hidrólise foi determinada por titulação com solução aquosa de NaOH 0,1 N, tendo sido utilizada a fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade hidrolítica (U) é definida como a quantidade de enzima que produz 1 micromole de ácido oleico por minuto. A perda de atividade devido à imobilização da rROL (expressa em U) foi estimada com base na seguinte equação:

$$\text{Atividade hidrolítica} = A_i - A_f \quad (\text{Equação 2})$$

onde  $A_i$  é a atividade inicial da solução enzimática,  $A_f$  é soma das atividades dos filtrados.

### 3.2.3. Ensaios de acidólise enzimática

Os ensaios de interesterificação foram realizados em reatores descontínuos de vidro de parede dupla, com capacidade de 25 cm<sup>3</sup>, sob agitação magnética (figura 3.3.), em meio livre de solvente.



Figura 3.3. – Reator cilíndrico de vidro de parede dupla.

Os parâmetros comuns para ambos os ensaios foram a razão molar TAG:AGL de 1:2 e a massa de biocatalisador, que correspondeu a 5% (m/m) dos TAG utilizados (tripalmitina ou óleo de gralha de uva).

A temperatura a que ocorreram os ensaios foi mantida estável por um circuito fechado com circulação de água aquecida por um banho termostatzado, no interior da parede dupla dos reatores.

Todos os reatores foram vedados com rolhas de borracha revestidas com papel de alumínio, para evitar a entrada de oxigénio, minimizando assim as reações de oxidação.

Nos ensaios de seleção do sistema reacional foram recolhidas amostras de 0,05 mL, às 0, 24 e 48h de reação. Ao recolher a amostra com a micropipeta, retirava-se apenas meio reacional. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -18 °C para análises posteriores.

### ***Ensaios de produção de HMFS***

A produção de HMFS foi realizada por acidólise de 3 g de tripalmitina (PPP) com 2,085 g de ácidos gordos livres do óleo de gralha de uva (razão molar AGL:PPP = 2:1). Para calcular a quantidade de óleo de gralha de uva, considerou-se a massa molecular do ácido linoleico, por ser o ácido gordo maioritário. Em seguida, adicionaram-se 0,15 g de rROL imobilizada em IRA96 ou de CPL ao meio reacional fundido.

As reações decorreram a 60 °C, durante 48h, sob agitação magnética. Os ensaios foram realizados em duplicado.

### **Ensaios de produção de MLM**

Para a produção dos MLM foi utilizado o óleo de grinha de uva como fonte de trilinoleína (LLL) e o ácido caprílico (C8:0) ou o ácido cáprico (C10:0), como fonte de ácidos gordos de cadeia média. Assim, realizou-se a acidólise de 3 g de óleo de grinha de uva com 0,98 g de C8:0 ou com 1,17 g de C10:0 (razão molar AGL:TAG = 2:1). Posteriormente adicionaram-se 0,15 g de rROL em IRA96 ou de CPL ao meio reacional fundido.

As reações decorreram a 40 °C, durante 48h, sob agitação magnética. Os ensaios foram realizados em triplicado.

De forma a facilitar a leitura, os quatro sistemas de produção de MLM foram identificados da seguinte forma: “rROL–C8:0”, “rROL–C10:0”, “CPL–C8:0” e “CPL–C10:0”.

#### **3.2.4. Ensaios cinéticos de acidólise e estudo da influência da temperatura na reação**

As condições reacionais para estes ensaios de produção de MLM mantiveram-se iguais às referidas em 3.2.3., exceto a temperatura a que ocorrem as reações e as horas de recolha das amostras.

Estes ensaios foram realizados a três temperaturas distintas: 30, 40 e 50 °C, a fim de investigar para qual temperatura existe maior produção de TAG novos. Foram recolhidas amostras às 0, 3, 5, 8, 24 e 48h de reação.

Não se realizaram ensaios de produção de HMFS a temperaturas abaixo de 60 °C para impedir a solidificação da tripalmitina nem a temperaturas superiores para não promover a inativação térmica das lipases testadas.

#### **3.2.5. Ensaios de estabilidade operacional dos biocatalisadores**

Os ensaios de reutilização do biocatalisador foram efetuados para a síntese de MLM e decorreram nas mesmas condições dos ensaios de interesterificação enzimática (*c.f.* 3.2.3.).

Foram realizadas 5 reutilizações sucessivas de 48h cada, a 40 °C, de modo a averiguar a estabilidade operacional de cada biocatalisador (rROL e CPL). Foram recolhidas amostras de 0,05 mL às 0, 24 e 48h de reação.

A cada 48h de reação, o biocatalisador foi removido do meio reacional e utilizado no ensaio seguinte com meio fresco. A filtração do meio foi feita com papel de filtro numa estufa a 50 °C, de forma a separar as partículas do biocatalisador do meio reacional. As amostras foram armazenadas a -18 °C, até análises posteriores.

Considerou-se que ao fim da primeira utilização de 48h, os biocatalisadores apresentavam 100 % da sua atividade inicial. A atividade residual no final de cada reutilização foi calculada em relação ao valor de atividade inicial do primeiro ensaio. Posteriormente, foi determinado o tempo de meia vida operacional para cada biocatalisador ( $t_{1/2}$ ) com ambos os ácidos gordos, ou seja, o tempo de utilização após o qual a atividade do biocatalisador se reduz a 50 %.

O ajuste dos modelos de inativação aos dados experimentais foi realizado utilizando o *solver*, uma ferramenta do *Microsoft Excel* para o *Windows*, pela minimização da soma dos quadrados dos erros entre os dados experimentais e os estimados pelo respetivo modelo. As definições da ferramenta *solver* foram: método de Newton; 100 iterações, precisão de  $10^{-5}$ ; 5 % de tolerância e 0,0001 de convergência.

### 3.2.6. Análise dos produtos de reação

#### 3.2.6.1. Derivatização e análise por cromatografia gasosa

Para analisar as várias amostras recolhidas ao longo dos diferentes ensaios, procedeu-se de acordo com o método adaptado da norma europeia EN 14105, de Abril de 2011, para a determinação de glicerol, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis em biodiesel.

O método de derivatização iniciou-se com a dissolução de 0,05 g da amostra a analisar em 10 mL de hexano. Desta solução, transferiram-se 0,5 mL para um balão de vidro periforme de 10 mL, que foi em seguida colocado no evaporador rotativo, a 40 °C, e pressão de 60 mbar, para evaporação do solvente.

Ao resíduo seco obtido, adicionaram-se 400 µL da solução do padrão interno para monoacilgliceróis (monodecanoína, PI Mono C19), 200 µL de piridina e 200 µL de N-metil-N-trimetil-silil-trifluoracetamida (MSTFA), e agitou-se vigorosamente. Os reagentes foram adicionados segundo a ordem referida e as amostras foram protegidas da humidade. Em seguida, aguardaram-se 15 minutos, à temperatura ambiente.

A solução de monodecanoína foi preparada diluindo  $0,05 \pm 0,001$  g de monodecanoína em 20 mL de tetra-hidrofurano. Entre utilizações, esta solução foi armazenada a 4 °C, mantendo-se estável durante 3 meses. A piridina e o MSTFA foram igualmente armazenados a 4 °C.

Após os 15 minutos referidos, adicionaram-se 4 mL de *n*-heptano à mistura, sendo posteriormente 1 µL desta solução analisada no cromatógrafo gasoso capilar, *Agilent Technologies* 7820A, munido de injetor on-column.

A separação e a identificação de uma mistura por cromatografia gasosa envolve três etapas principais: injeção da amostra no cromatógrafo gasoso, separação da amostra nos seus diferentes componentes (dentro da coluna do forno) e deteção dos componentes que estavam presentes na amostra (no detetor).

As amostras são introduzidas no injetor por intermédio de uma seringa. A amostra é arrastada pela fase móvel (gás de arraste) ao longo da coluna cromatográfica. Pela aplicação de um programa de rampas de temperatura os diferentes compostos da mistura são separados. Estes compostos saem da coluna transportados no gás de arraste e passam pelo detetor de ionização de chama onde irão sofrer pirólise à temperatura da chama de ar, pela ação do hidrogénio, produzindo iões e eletrões que conduzem eletricidade através da chama. Enquanto cada componente entra no detetor, é gerado um sinal elétrico proporcional à quantidade do

componente detetado. Esse sinal geralmente é enviado para um sistema de análise de dados, sendo representado por um pico no cromatograma.

As temperaturas do injetor e do detetor mantiveram-se a 50 °C e 370 °C, respetivamente. Utilizou-se hélio como gás transportador, a um caudal de 25 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor a caudais de 300 mL/min e 30 mL/min, respetivamente.

Para a análise das amostras, o programa de rampas de temperatura foi ajustado da seguinte forma: 50 °C durante 1 min; aumento para 180 °C a uma taxa de 15 °C/min; manutenção da temperatura a 180 °C durante 10 min; aumento para 230 °C a uma taxa de 7 °C/min; manutenção da temperatura a 230 °C durante 7 min; aumento para 370 °C a uma taxa de 10 °C/min; patamar final a 370 °C durante 26 min. Assim o tempo total de corrida foi de 43 minutos.

### **3.2.6.2. Quantificação dos substratos e produtos da reação**

Da análise cromatográfica das amostras, obtiveram-se os cromatogramas com as áreas dos picos e os tempos de retenção (em minuto) dos diferentes compostos existentes nas amostras iniciais e nas recolhidas ao longo da reação.

Na figura 3.4. estão representados dois cromatogramas, o primeiro (A) referente à amostra do tempo inicial e o segundo (B) referente à amostra recolhida após 48h de uma das reações de acidólise para a produção de MLM. Na figura 3.5. estão representados também dois cromatogramas, referentes à produção de HMFS.

Nos cromatogramas fez-se corresponder a cada pico de interesse o respetivo composto ou espécie de compostos, de acordo com o seu tempo de retenção ( $t_r$ ), por comparação com padrões de referência e com os padrões apresentados na norma EN 14105, Abril de 2011.

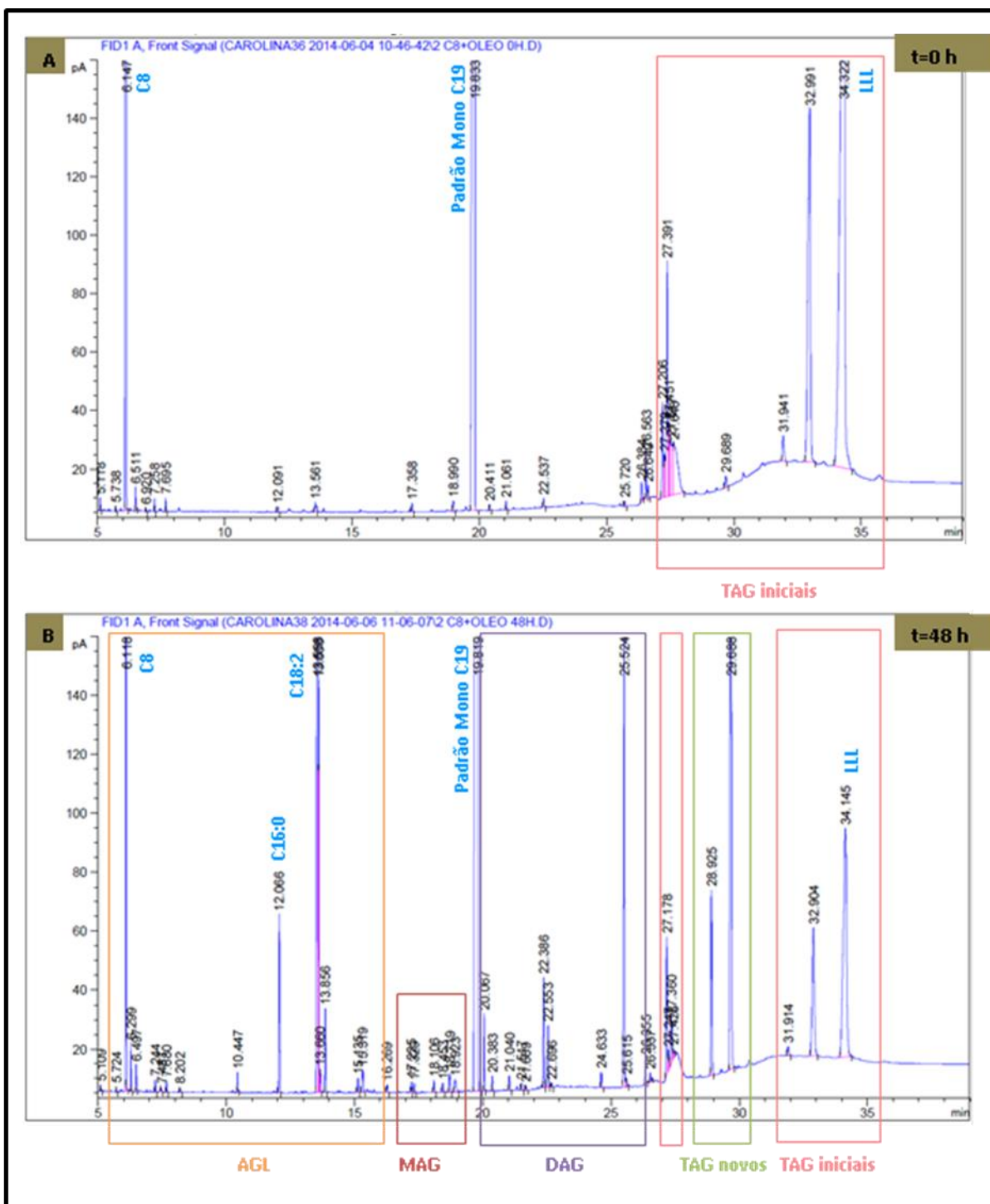


Figura 3.4. – Cromatogramas relativos, respetivamente, às 0h (A) e 48h (B), de uma das reações de acidólise entre os triacilgliceróis do óleo de gralha de uva e o ácido caprílico, catalisada pela rROL para a produção de MLM.

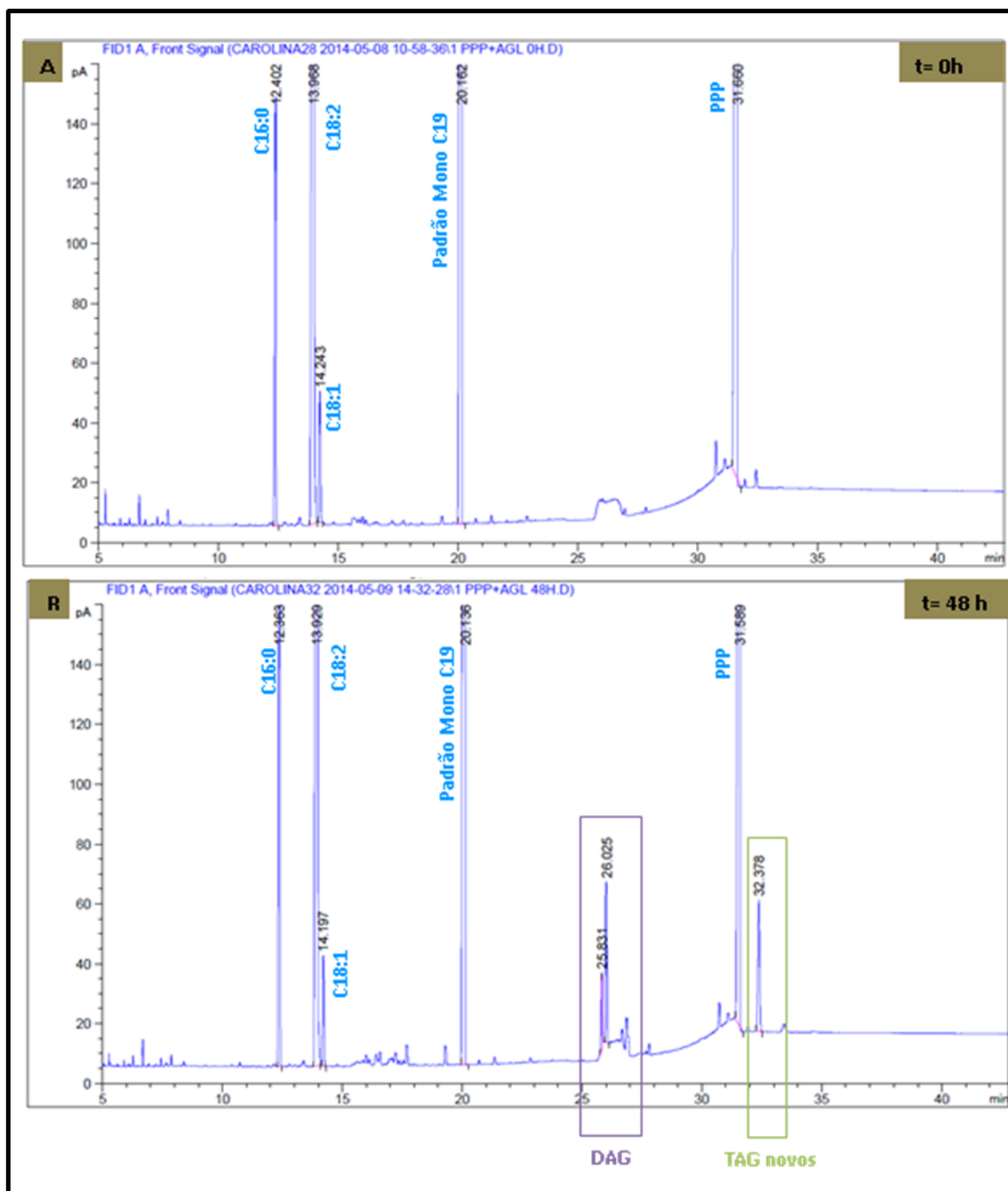


Figura 3.5. – Cromatogramas relativos, respectivamente, às 0h (A) e 48h (B) de uma das reações de acidólise entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres do óleo de gralha de uva, catalisada pela rROL para a produção de HMFS.

Os padrões de referência utilizados foram a trioleína ( $t_r = 35,24$  min), a tripalmitina ( $t_r = 31,79$  min), a monodecanoína ( $t_r = 20,42$  min), o ácido linoleico ( $t_r = 13,58$  min), o ácido cáprico ( $t_r = 7,68$  min) e o ácido caprílico ( $t_r = 6,12$ ).

Os conjuntos de picos referentes aos MAG, DAG e AGL, foram reconhecidos pois, de acordo com a norma europeia EN 14105, Abril de 2011, os MAG possuem um tempo de retenção compreendido entre aproximadamente 17,8 e 20 minutos, os DAG entre cerca de 20 e 25 minutos, e os AGL têm tempos de retenção inferiores a 17 minutos. Dada a reduzida



importância que os MAG e DAG apresentam para o trabalho em causa, não foi realizada a sua quantificação.

Uma vez que a presença de ácido linoleico (C18:2) livre provém da hidrólise da trilinoleína (LLL), este ácido gordo foi quantificado isoladamente, pois a LLL é o TAG maioritário do óleo de gralha de uva.

A curva de calibração da figura 3.6. permite a quantificação do C18:2 consumido ao longo da reação de produção de HMFS, ou libertado na reação de produção de MLM a partir do óleo de gralha de uva, utilizando a monodecanoína como padrão interno.

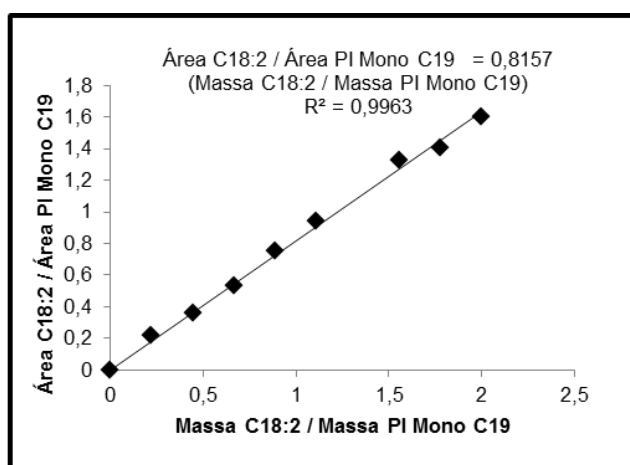


Figura 3.6. – Curva de calibração para o ácido linoleico.

Os ácidos gordos caprílico e cáprico também puderam ser facilmente quantificados a partir das suas respetivas curvas de calibração (figura 3.7.).

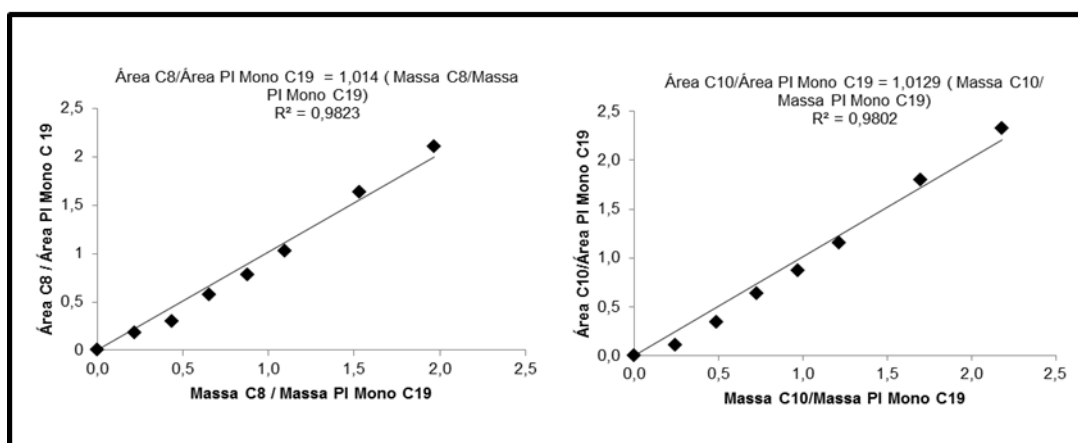


Figura 3.7. – Curvas de calibração para o ácido caprílico e para o ácido cáprico.

Para quantificar a massa de AGL (à exceção de C8:0 e de C10:0) presentes numa determinada amostra, recorreu-se à equação da curva de calibração do ácido linoleico (figura 3.6.), por falta de padrão de referência para cada um dos AGL presentes.

Para o sistema de produção de HMFS, os TAG iniciais e consumidos foram expressos em termos de tripalmitina.

No sistema de produção de MLM, a trioleína foi utilizada como padrão de referência em vez da trilinoleína, pois o laboratório não dispunha deste composto. Assim, os TAG iniciais e consumidos foram expressos em termos de trioleína.

As curvas de calibração para a tripalmitina e para a trioleína são apresentadas na figura 3.8., também foi utilizada a monodecanoína como padrão interno.

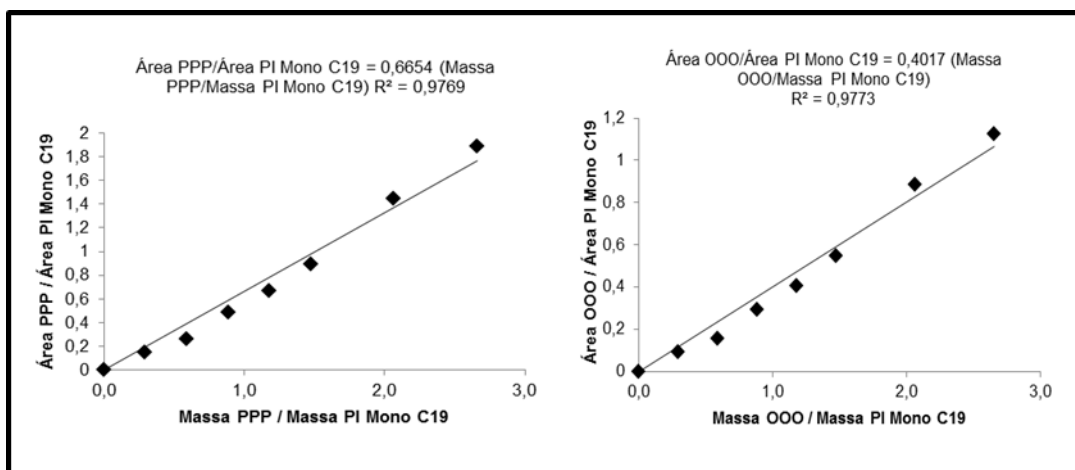


Figura 3.8. – Curvas de calibração para a tripalmitina e para a trioleína.

A taxa de conversão (X) de um determinado composto foi calculada pela razão entre a quantidade de substrato consumido ao longo da reação e a quantidade de substrato inicial. Assim, foram calculadas as taxas de conversão (% m/m ou mol/mol) para C8:0, C10:0 e TAG, de acordo com a seguinte fórmula:

$$X = \frac{\text{Substrato}_{\text{consumido}}}{\text{Substrato}_{\text{inicial}}} \times 100 \% \quad (\text{Equação 4})$$

Aplicando esta fórmula para exemplificar o cálculo da taxa de conversão em TAG, tem-se a razão entre a massa de TAG consumidos (g) ao longo da reação e a massa de TAG iniciais (g):

$$X_{\text{TAG}} = \frac{\text{TAG}_{\text{consumidos}}}{\text{TAG}_{\text{iniciais}}} \times 100 \% \quad (\text{Equação 5})$$

A massa de TAG consumidos obtém-se pela diferença entre a massa de TAG no tempo zero ( $TAG_0$ ), e a massa de TAG residuais no tempo  $t$  de reação ( $TAG_t$ ):

$$TAG_{\text{consumidos}} = TAG_0 - TAG_t \quad (\text{Equação 6})$$

A massa de TAG no tempo  $t$  de reação é calculada de acordo com a equação da curva de calibração do respetivo TAG em análise (OOO ou PPP) (figura 3.8.).

A quantificação de TAG novos foi expressa em rendimento mássico ( $\eta$ ; % m/m), de acordo com a equação da definição de rendimento:

$$\eta = \frac{\text{Produto}_{\text{formado}}}{\text{Substrato}_{\text{inicial}}} \times 100 \% \quad (\text{Equação 7})$$

Aplicando a equação a este caso, tem-se:

$$\eta_{TAG_{\text{novos}}} = \frac{TAG_{\text{produzidos}}}{TAG_{\text{iniciais}}} \times 100 \% \quad (\text{Equação 8})$$

No cálculo da massa de TAG produzidos foi também utilizada a curva padrão da OOO ou da PPP, consoante se esteja a produzir MLM ou HMFS, respetivamente.

### 3.2.6.3. Análise estatística

De modo a investigar eventuais diferenças significativas entre os rendimentos em TAG novos e taxas de conversão de TAG iniciais e C8:0 ou C10:0, para os diferentes biocatalisadores e respetivos sistemas utilizados, foi realizada uma análise de variância a um fator (ANOVA a 1 fator), através do programa Statistica™, versão 6, da Statsoft, Tulsa, OK, U.S.A.. Assim, foram realizados testes de comparações múltiplas usando o teste de Tukey com  $p\text{-value} \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Rendimento de imobilização de rROL em Amberlite™ IRA96

A concentração de proteína, antes e após imobilização, foi estimada com base na curva de calibração de absorvância vs. concentração de BSA, utilizada como padrão (figura 3.2.). Esta curva pode ser descrita pela equação 9, para a qual se obteve um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9962, onde a concentração de proteína vem expressa em mg de BSA/mL de solução.

$$\text{Abs}_{595\text{ nm}} = 0,6949 [\text{Proteína}] \quad (\text{Equação 9})$$

A quantidade de proteína imobilizada, obtida pela diferença entre a quantidade de proteína presente na solução enzimática pela quantidade de proteína residual presente no primeiro filtrado, foi de 0,935 mg/g IRA96. O rendimento calculado de imobilização efetiva de proteína no suporte IRA96, foi de 22,3 %, de acordo com a equação 1 (c.f. 3.2.2.).

O rendimento de imobilização relativo à atividade hidrolítica real do biocatalisador foi de 35,6 % enquanto o de imobilização proteica foi de apenas 22,3 %. Esta situação pode resultar do facto de haver uma maior afinidade para o suporte por parte das moléculas de rROL do que das proteínas sem atividade catalítica presentes no extrato liofilizado que se utilizou como fonte de rROL.

### 4.2. Determinação da atividade hidrolítica dos biocatalisadores

A avaliação da atividade hidrolítica da lipase de *Carica papaya* foi realizada para a enzima naturalmente imobilizada no látex da papaia, obtendo-se um valor de 6982 U/g expressos em micromole de ácido oleico/minuto.

A atividade hidrolítica da rROL imobilizada foi calculada de forma indireta, através da determinação das atividades hidrolíticas da solução enzimática inicial e das soluções de lavagem do biocatalisador, após imobilização. O valor obtido foi de 904 U/g de biocatalisador (rROL + IRA96), calculado de acordo com a equação 2 (c.f. 3.2.2.). Quando se determinou diretamente a atividade hidrolítica da rROL imobilizada em IRA96, o valor foi de apenas 497 U/g, ou seja, 55 % do valor obtido por via indireta.

Assim, o rendimento em termos de atividade hidrolítica estimada da enzima imobilizada foi de 64,7 %, enquanto que o rendimento determinado através da atividade hidrolítica real do biocatalisador foi de apenas 35,6 %. Estas diferenças de atividades e rendimentos podem explicar-se por uma inativação da enzima aquando da sua imobilização, ou por efeitos estereoquímicos que impeçam a atividade catalítica.

É de notar que a atividade hidrolítica da rROL não coincide nem é proporcional à sua atividade de interesterificação (Nunes *et al.*, 2012). As atividades hidrolíticas das preparações lipásicas utilizadas neste estudo foram determinadas apenas para avaliar se as enzimas tinham

atividade catalítica, mas não indicam *a priori* qual a preparação com maior atividade catalítica na acidólise.

### 4.3. Ensaios de síntese de lípidos estruturados

#### 4.3.1. Síntese de sucedâneos da gordura de leite humano

A produção de sucedâneos da gordura de leite humano, ou HMFS “Human Milk Fat Substitutes” foi avaliada através do rendimento em novos TAG, do consumo de tripalmitina (PPP) e de ácido linoleico (C18:2).

Pela análise dos cromatogramas apresentados na figura 4.2., constata-se que não houve produção de novos TAG, ao longo das 48h da reação, quando foi utilizado como biocatalisador a lipase de *Carica papaya*. Este resultado era previsível, pois de acordo com outros autores, a CPL apresenta baixa atividade na presença de ácidos gordos polinsaturados (quadro 4), como é o caso do ácido linoleico, maioritário no óleo de grinha de uva.

Alguns autores, como a maioria dos que são referidos em seguida, em vez de expressarem os seus resultados em grau de conversão e em rendimento mássico tal como foi feito no presente trabalho, calcularam a percentagem de incorporação molar de ácidos gordos nos TAG como forma de avaliar a atividade enzimática e proceder a comparações entre as diferentes amostras.

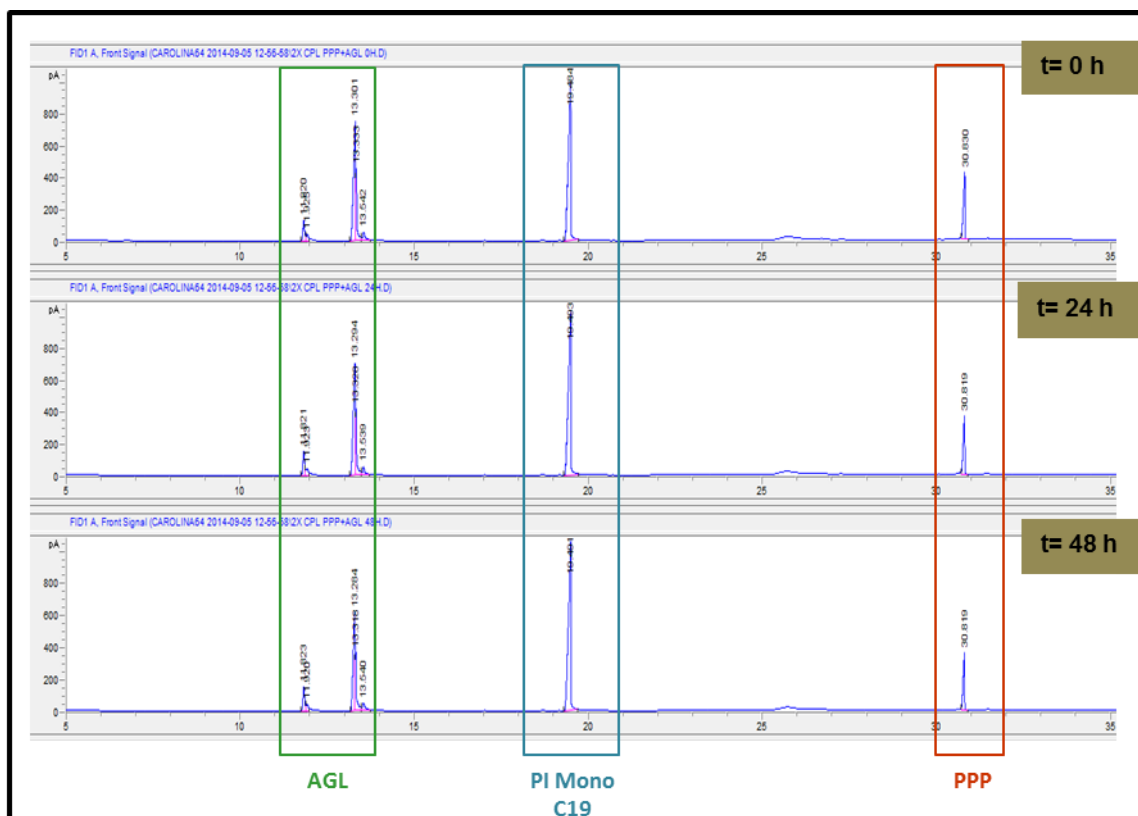


Figura 4.2. – Exemplo de cromatogramas das 0h, 24h e 48h de uma das reações de acidólise entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres do óleo de grinha de uva, catalisada pela lipase de *Carica papaya* para a produção de HMFS.

Assim, Tecelão *et al.* (2012) estudaram a reação de acidólise entre a tripalmitina e um concentrado de PUFA rico em ácido docosa-hexanóico (DHA), “EPAX 1050 TG”, que decorreu a 60 °C, em meio livre de solvente, durante 24h. Foram testados vários biocatalisadores, entre os quais a lipase de *Carica papaya* auto-imobilizada no seu látex, que apresentou o resultado de incorporação de AGL mais baixo (8,7 mol-%). Quando se utilizou como fonte de AGL, o ácido oleico (C18:1), em vez do concentrado de PUFA, o resultado de incorporação de AGL foi cerca de 22 mol-%.

Simões (2011) obtiveram uma incorporação molar de PUFA de 8,0 % com a lipase de *Carica papaya*, após 24h de reação de acidólise a 50 °C, entre banha em rama e “EPAX 1050 TG”. No entanto, nas mesmas condições, foi testada a rROL imobilizada em Accurel MP 1000, cujo resultado de incorporação molar de PUFA foi cerca de 16,9 %. De facto, quando foi utilizada a rROL imobilizada em IRA96 nas reações de acidólise para a produção de HMFS do presente estudo (figura 3.5.), já houve formação de alguns TAG novos, embora apresentando baixos rendimentos (10,4 % (m/m)). Também Severino (2014), utilizando a tripalmitina, obteve valores de incorporação molar de AGL do óleo de gralha de uva de 10,8 % e de 9,7 %, respetivamente, com a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e em Relizyme OD403/S. Os baixos rendimentos desta lipase podem se dever a uma possível desnaturação da enzima, pois os ensaios de síntese de HMFS decorreram a 60 °C.

Faustino (2014) ao utilizar a tripalmitina, obteve valores de incorporação molar de PUFA do óleo de camelina de 43,3 % para a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600, e de 19,5 % para a rROL em Relizyme OD403/S.

Quadro 4 – Resultados de incorporação molar de ácidos gordos livres para a rROL e para a lipase de *Carica papaya*, em diferentes meios reacionais e em diferentes estudos.

Autores	Biocatalisador e suporte de imobilização	Composição do meio reacional (fonte de TAG + fonte de AGL)	Incorporação de AGL nos TAG (mol- %)
Tecelão (2011)	rROL em Lewatit VP OC 1600	PPP + C18:1	18,4
	rROL em Accurel MP1000	PPP + C18:1	15,7
	rROL em Eupergit C	PPP + C18:1	4,2
	CPL	PPP + C18:1	22,1
	CPL	PPP + PUFA	8,7
Simões (2011)	rROL em Accurel MP1000	Banha + PUFA	16,9
	CPL	Banha + PUFA	8,0
Faustino (2014)	rROL em Lewatit VP OC 1600	PPP + AGL do óleo de camelina	43,3
	rROL em Relizyme OD403/S	PPP + AGL do óleo de camelina	19,5
Severino (2014)	rROL em Lewatit VP OC 1600	PPP + AGL do óleo de gralha de uva	10,8
	rROL em Relizyme OD403/S	PPP + AGL do óleo de gralha de uva	9,7

#### 4.3.2. Síntese de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM

A produção de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM foi avaliada através do rendimento em novos TAG, do consumo de ácido cáprico ou caprílico e pelo consumo de TAG iniciais.

A figura 4.3. apresenta exemplos de dois cromatogramas da reação de acidólise entre o óleo de gralha de uva e o ácido cáprico, a 40 °C, utilizando como biocatalisador a rROL imobilizada em IRA96. Comparando o cromatograma das 0h com o cromatograma das 48h, pode-se observar uma grande produção de novos TAG, MAG e DAG com libertação de ácidos gordos do óleo de gralha de uva ao longo da reação. O mesmo se verificou para as três repetições efetuadas deste ensaio.

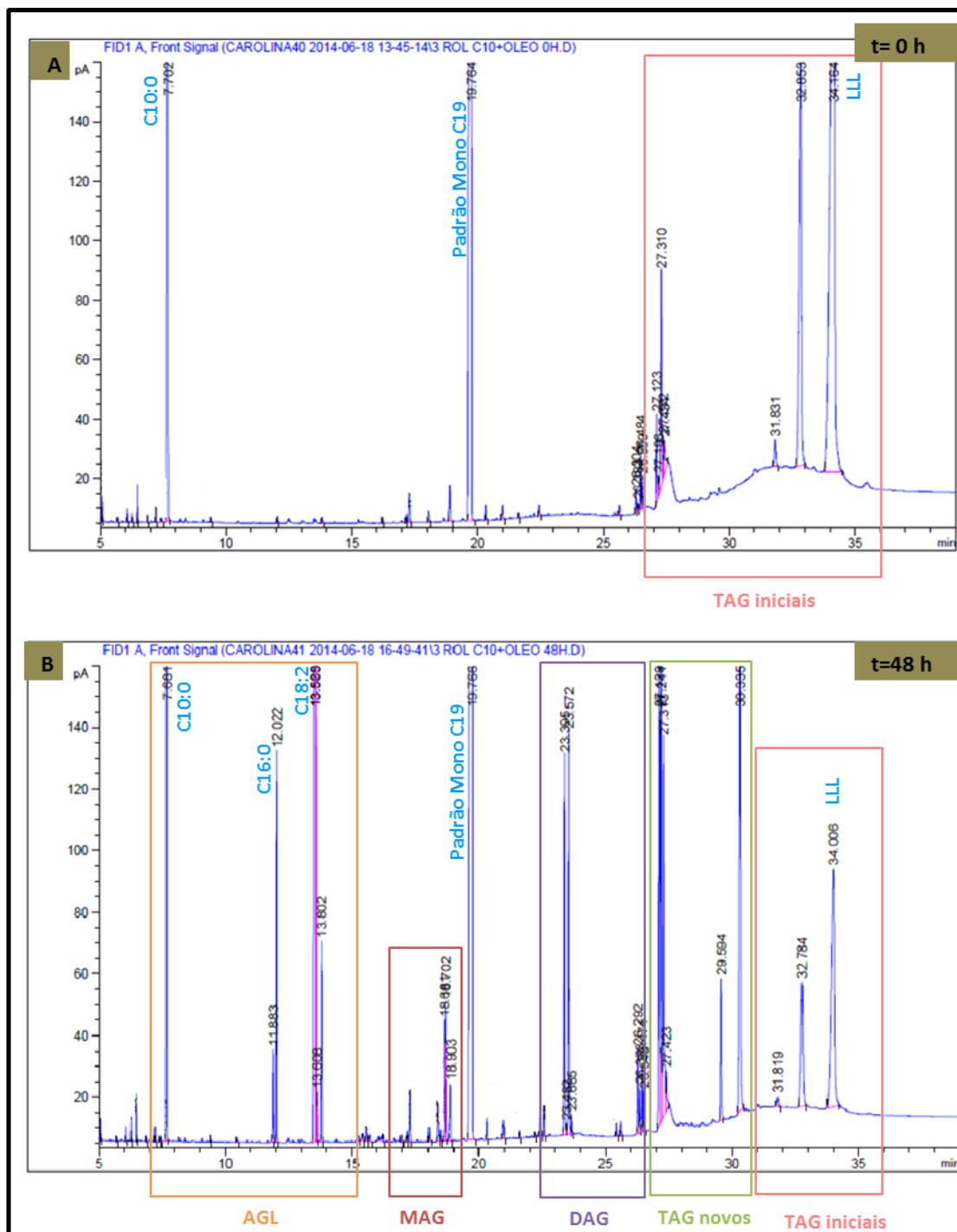


Figura 4.3. – Cromatogramas relativos, respectivamente, às 0h (A) e 48h (B) de uma das reações de acidólise entre os triacilgliceróis do óleo de grinha de uva e o ácido cáprico, catalisada pela lipase rROL, para a produção de MLM.

Comparando os rendimentos obtidos em TAG novos através da figura 4.4., pode-se constatar que o sistema com maior produção de TAG novos foi o sistema rROL – C8:0. Este sistema atingiu, às 24h de reação, um rendimento em TAG novos de 68,5 % (m/m). Este valor manteve-se constante às 48h de reação, ao apresentar um rendimento de 66,8 % (m/m), pelo que se pode afirmar que foi atingido um equilíbrio às 24h de reação.



Em presença de C10:0, para o sistema catalisado pela rROL obtiveram-se rendimentos em TAG novos às 24h (52,4 % (m/m)) muito semelhantes aos obtidos às 48h (54,3 % (m/m)). Tal indica que neste sistema a reação também terá atingido o equilíbrio às 24h.

Para os sistemas em que foi utilizada a lipase de *Carica papaya*, os valores dos rendimentos em TAG novos foram de 24,3 e 29,5 % (m/m) às 24h de reação para o C8:0 e C10:0, respetivamente. Às 48h, os valores foram de 40,8 e 36,2 % (m/m), para o C8:0 e C10:0, respetivamente.

Relativamente às figuras 4.4., 4.5. e 4.6., letras iguais para cada tipo de resposta (TAG novos, TAG consumidos e C8:0 ou C10:0 consumidos), indicam que não há diferenças significativas entre esses resultados, para  $p\text{-value} \leq 0,05$ .

Assim, pela análise da figura 4.4, pode-se constatar que apesar das produções de TAG novos obtidas com a CPL serem inferiores às produções obtidas com a rROL, não se verificaram diferenças significativas relativamente às produções de TAG novos nos sistemas rROL–C10:0, CPL–C8:0 e CPL–C10:0, às 48h de reação. Como a lipase de *Carica papaya* é um biocatalisador quase a custo zero, decidiu-se dar continuidade aos estudos desta lipase como biocatalisador da síntese de MLM. Também é de notar que, tal como foi observado anteriormente para a rROL (Nunes *et al.*, 2012), uma atividade hidrolítica muito elevada da CPL não se traduziu numa atividade de acidólise igualmente elevada.

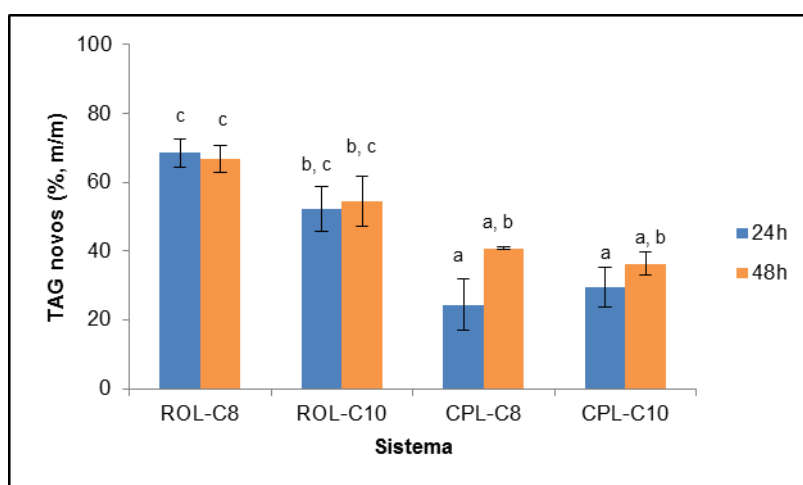


Figura 4.4. – Rendimentos em TAG novos para os quatro sistemas de produção de MLM, às 24 e 48h de reação.

Nunes *et al.* (2011) estudaram a reação de acidólise entre azeite virgem extra e C8:0 ou C10:0, a 40 °C, em meio livre de solvente, também com intuito de produzir MLM. Para tal utilizaram lipases *sn*-1,3 seletivas imobilizadas, nomeadamente a lipase de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM), de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), de *Candida antarctica* (Novozym 435), e a rROL imobilizada em Eupergit C e em Sepiolite modificada. Os valores médios de incorporação molar às 24h de reação, para o C8:0 foram de 19,9; 25,7; 25,5; 21,6; 4,38 mol-%, respetivamente, para as enzimas acima referidas e respetivos suportes. Para o

C10:0 os valores correspondentes foram, respetivamente, 28,8; 27,1; 30,4; 34,8 e 5,48 mol- %. Estes valores traduzem a preferência, apesar de pouco acentuada, da rROL e das outras lipases pelo C10:0, ao contrário do que foi observado no estudo realizado na presente tese, que indicou a preferência da rROL e da lipase de *Carica papaya* pelo C8:0. É possível que o suporte IRA96 tenha mais afinidade para o C8:0 do que para o C10:0, favorecendo a sua entrada no micro-ambiente da lipase e, assim, a reação de acidólise.

A lipase de *Yarrowia lipolytica* revelou também maiores incorporações de C8:0 do que de C10:0 na produção de MLM a partir de azeite virgem extra, na ausência de solvente (Casas-Godoy *et al.*, 2013).

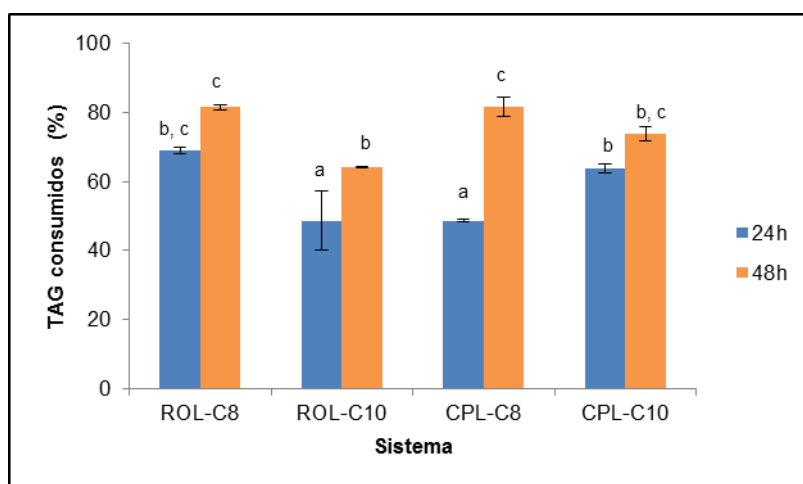


Figura 4.5. – Consumo de TAG iniciais para os quatro sistemas de produção de MLM, às 24 e 48h de reação.

Relativamente ao consumo de TAG (figura 4.5.), este não apresentou o mesmo comportamento que a produção de novos TAG: as amostras agrupam-se também em três grupos homogêneos, mas não coincidentes como os observados na produção de TAG novos. É possível que na origem destas diferenças estejam produções de acilgliceróis parciais diferentes. De facto, o grande valor de atividade hidrolítica obtido para a CPL explica os elevados valores de TAG consumidos nos sistemas CPL – C8:0 e CPL – C10:0, às 48h de reação, através da reação de hidrólise.

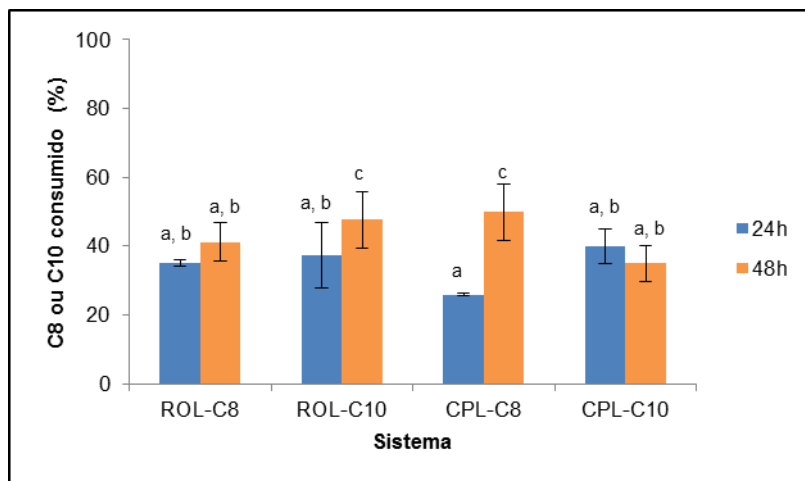


Figura 4.6. – Consumos de ácido caprílico ou cáprico, para os quatro sistemas de produção de MLM, às 24 e 48h de reação.

No que respeita ao consumo de C8:0 ou C10:0 (figura 4.6.), apenas se verificaram diferenças significativas entre o resultado obtido para o sistema CPL–C8:0–24h e os resultados obtidos com a rROL e com a CPL, após 48h de reação, em presença de C10:0 e C8:0, respetivamente.

Após este estudo inicial de avaliação dos rendimentos em TAG novos, com o intuito de produzir HMFS e MLM sob condições de ensaio e meios reacionais previamente estabelecidos, os maiores rendimentos foram obtidos aquando da produção de MLM, pelo que se optou pelo estudo mais aprofundado sobre a produção deste tipo de lípidos estruturados.

#### 4.4. Influência da temperatura na reação de produção de triacilgliceróis dietéticos

Os ensaios ao longo do tempo fornecem informações adicionais sobre a velocidade inicial da reação e sobre o momento em que se atinge o equilíbrio cinético.

O tempo que decorre até se atingir uma situação de *quasi*-equilíbrio depende do biocatalisador em causa, dos substratos utilizados e das condições do meio reacional. O conhecimento do tempo que decorre até se atingir este patamar é bastante importante, pois permite otimizar o tempo de reação.

No caso do presente trabalho recorreu-se ao acompanhamento da reação ao longo de 48h. Assim, realizaram-se novamente todas as reações de acidólise referidas anteriormente para a produção de MLM, mas nestes ensaios recolheram-se amostras às 0, 3, 5, 8, 24 e 48h de reação. Os ensaios foram realizados a 30, 40 e 50 °C, a fim de investigar para qual temperatura existe maior produção de TAG novos.

Com os resultados destes ensaios elaboraram-se os gráficos das figuras 4.7., 4.8., 4.9. e 4.10.. Estas figuras retratam a evolução do consumo de TAG iniciais, do consumo do ácido gordo de cadeia média utilizado, e a produção de novos TAG.

As figuras 4.7. e 4.8. apresentam a evolução das reações de acidólise entre o óleo de gralha de uva e o ácido cáprico ou caprílico, catalisadas pela rROL imobilizada em IRA96. Relativamente ao consumo de TAG iniciais, os valores obtidos foram ligeiramente maiores para o sistema com C8:0 do que para o sistema com C10:0. A variação de temperatura dos ensaios não alterou muito estes valores, às 48h de reação. Também após 48h, o consumo de C8:0 e C10:0 foi muito semelhante para as três temperaturas testadas.

O capítulo 4.3.2. apresenta os rendimentos em TAG novos obtidos com a rROL imobilizada em IRA96, para ambos os ácidos gordos utilizados, às 24 e 48h de reação, a 40 °C. Quando os mesmos ensaios foram realizados a 30 e a 50 °C, obtiveram-se rendimentos em TAG novos bastante inferiores aos observados a 40 °C, como se pode ver pelas figuras 4.7. e 4.8.. Assim sendo, 40 °C foi a temperatura escolhida para os ensaios subsequentes de reutilização da rROL imobilizada em IRA96.

Através da análise das figuras 4.7. e 4.8. também é possível verificar que, na maioria dos casos, os consumos de TAG iniciais, C8:0 ou C10:0, tendem para uma situação de *quasi*-equilíbrio após 24h de reação, para qualquer das temperaturas testadas.

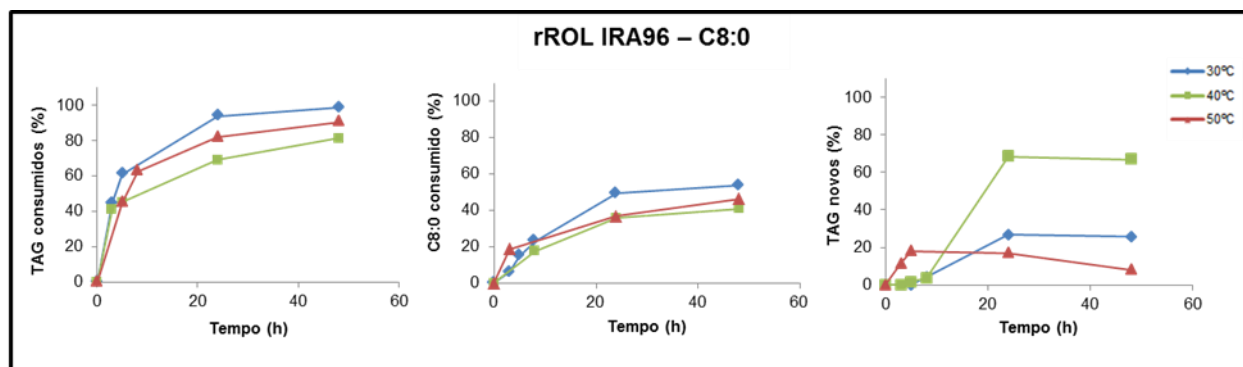


Figura 4.7. – Evolução do consumo de TAG iniciais, de ácido caprílico, e da produção de TAG novos, ao longo de 48h de reação de acidólise entre o óleo de gralha de uva e o ácido caprílico, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela rROL imobilizada em IRA96.

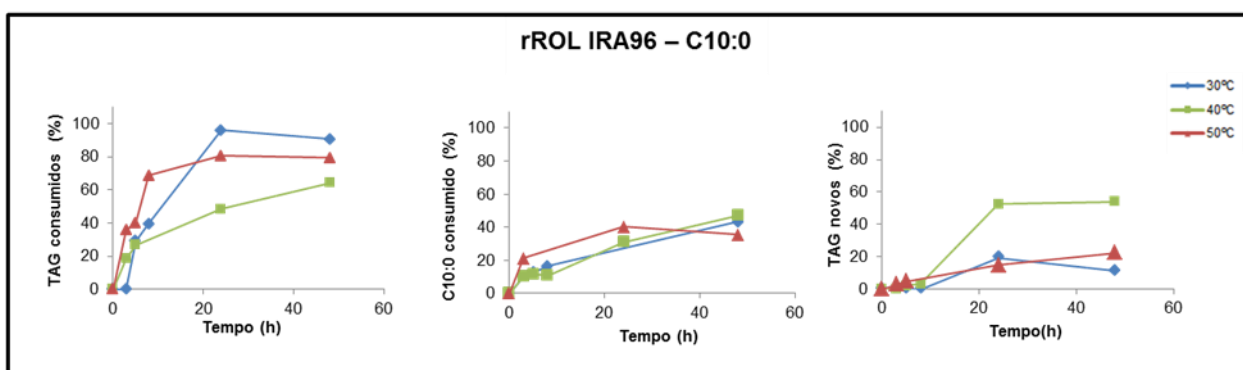


Figura 4.8. – Evolução do consumo de TAG iniciais, de ácido cáprico e da produção de TAG novos, ao longo de 48h de reação de acidólise entre o óleo de gralha de uva e o ácido cáprico a 30, 40 e 50 °C catalisada pela rROL imobilizada em IRA96.

A evolução das reações de acidólise entre o óleo de gralha de uva e o ácido cáprico ou caprílico, catalisadas pela lipase de *Carica papaya*, é apresentada nas figuras 4.9. e 4.10..

Para o sistema CPL – C8:0, as percentagens dos três grupos de compostos analisados é notoriamente inferior à temperatura de 30 °C, tendo apresentado valores muito semelhantes

para as temperaturas de 40 e 50 °C, às 48h de reação. Estes resultados sugerem que as temperaturas ótimas para a lipase de *Carica papaya* sejam superiores a 30 °C. De facto, esta lipase revelou ser cataliticamente ativa na produção de HMFS a partir de tripalmitina e ácido oleico, em meio livre de solvente e à temperatura de 60 °C (Tcelão *et al.*, 2012).

No que diz respeito ao sistema CPL – C10:0, este não apresentou diferenças notórias de valores de TAG consumidos após 48h de reação, com a variação de temperatura dos ensaios. No entanto, a percentagem de C10:0 consumido às 48h foi muito maior à temperatura de 30 °C, apesar de não se refletir na produção de TAG novos, que mais uma vez é superior à temperatura de 40 °C.

Relativamente à produção de novos TAG nos sistemas catalisados pela CPL, apesar desta parecer ser mais lenta do que nos sistemas catalisados pela rROL, os resultados também apontam, nalguns ensaios, para uma situação de *quasi*-equilíbrio a partir das 24h. De uma forma global, pode-se observar que o andamento das reações de acidólise a 30, 40 ou 50 °C com a lipase de *Carica papaya* é semelhante ao observado com a rROL imobilizada em IRA96.

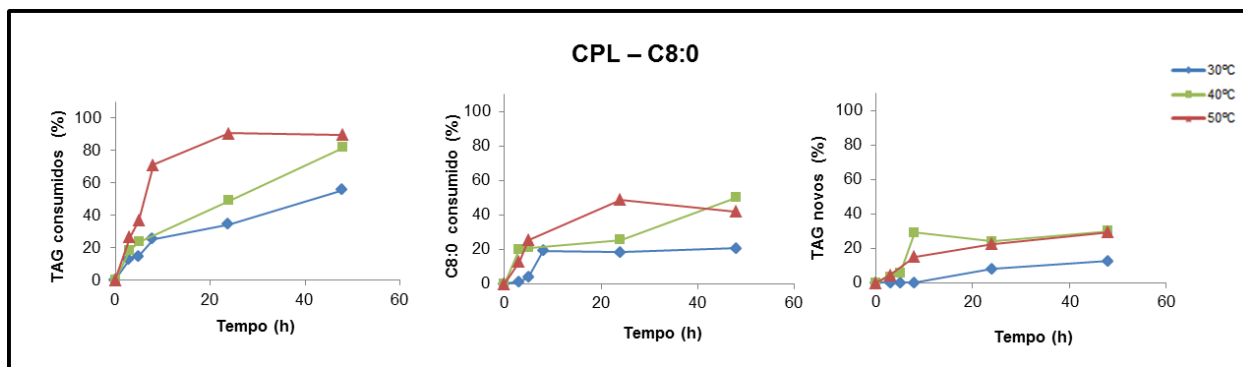


Figura 4.9. – Evolução do consumo de TAG iniciais, de ácido caprílico, e da produção de TAG novos, ao longo de 48h de reação de acidólise entre o óleo de grinha de uva e o ácido caprílico, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela lipase de *Carica papaya*.

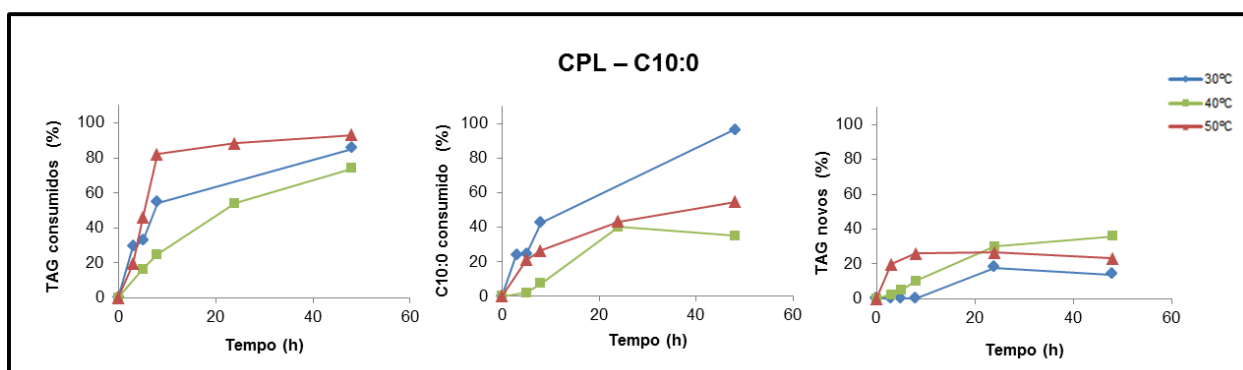


Figura 4.10. – Evolução do consumo de TAG iniciais, de ácido cáprico, e da produção de TAG novos, ao longo de 48h de reação de acidólise entre o óleo de grinha de uva e o ácido cáprico, a 30, 40 e 50 °C catalisada pela lipase de *Carica papaya*.

Com os resultados destes estudos cinéticos, calcularam-se as velocidades iniciais de formação de TAG novos para os quatro sistemas de produção de MLM às diferentes temperaturas testadas (figura 4.11.).

Sabe-se, pelo estudo da equação de Arrhenius (equação 10), que a temperatura tem efeitos significativos na cinética da reação. A variação da constante de velocidade,  $k$ , com a temperatura, é descrita por:

$$k = A e^{-\frac{E}{RT}} \quad (\text{Equação 10})$$

Em que  $k$  é a constante de velocidade,  $A$  é a constante de Arrhenius,  $E$  é a energia de ativação da reação,  $R$  é a constante do gás ideal e  $T$  é a temperatura absoluta.

De acordo com esta equação, quando a temperatura aumenta, a velocidade da reação aumenta exponencialmente. No entanto, quando se trata de reações catalisadas por enzimas, a gama de temperaturas é limitada. Apesar da velocidade da reação aumentar com a temperatura, a velocidade a que uma enzima é inativada também aumenta com a temperatura e, consequentemente, a velocidade da reação diminui rapidamente.

Através da análise da figura 4.11., verifica-se para todos os sistemas o efeito esperado de aumento da velocidade inicial da reação com o aumento da temperatura dos ensaios. No entanto, elevadas velocidades iniciais não correspondem necessariamente a elevadas percentagens de formação de TAG novos. Por exemplo, o sistema CPL–C10:0 é o que apresenta maior velocidade inicial de produção de TAG novos a 50 °C, mas o seu rendimento às 48h de reação é de apenas 23,0 % (m/m). Comparando este valor com o obtido para o mesmo sistema a 40 °C, tem-se um maior rendimento em TAG novos de 36,2 % (m/m) apesar de se observar uma velocidade inicial de reação bastante menor.

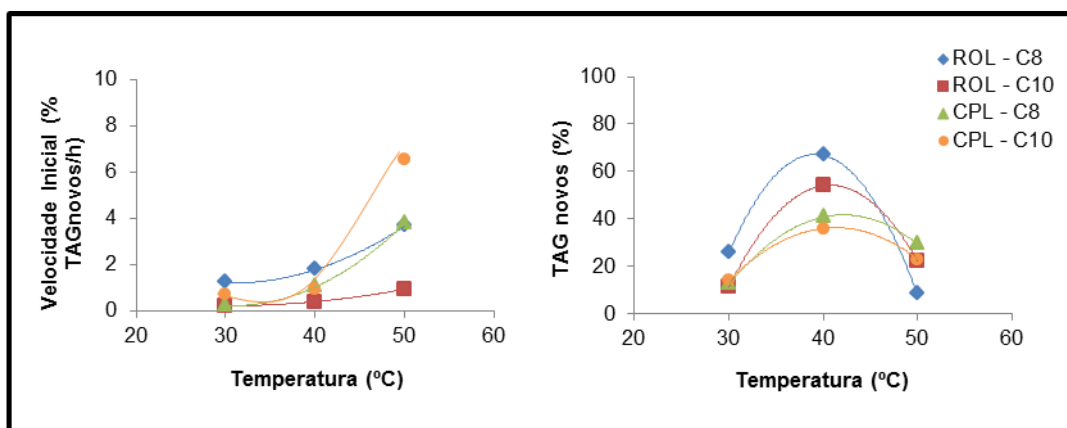


Figura 4.11. – Velocidades iniciais de formação de TAG novos para 30, 40 e 50 °C, e rendimento em TAG novos após 48h de reação, nos quatro sistemas em análise para a produção de MLM.

Também se pode concluir que, apesar de 50 °C ser a temperatura à qual as velocidades iniciais de produção de novos TAG são maiores, é a 40 °C que são observados maiores rendimentos de novos TAG, para todos os sistemas em análise.

É de notar que, de 30 para 40 °C, a produção de TAG novos aumenta consideravelmente. No entanto, de 40 para 50 °C verifica-se uma diminuição, com os valores de TAG novos

produzidos a serem semelhantes aos obtidos à temperatura de 30 °C. Tal facto reforça que a temperatura ideal para a produção de TAG dietéticos do tipo MLM, a partir de óleo de grinha de uva e de C8:0 e C10:0, sob as condições descritas, é 40 °C.

Simões *et al.* (2014) otimizaram as condições da reação de acidólise (temperatura e razão molar dos substratos) entre um concentrado PUFA e banha, catalisada pela rROL imobilizada em Accurel MP 1000. A maior incorporação, 24 mol-%, foi conseguida a 40 °C e a uma razão molar de AGL: banha de 3:1.

Nunes *et al.* (2011) obtiveram incorporações de C8:0 e de C10:0 de, respetivamente, 21,6 e 34,8 mol-% a 40 °C, em meio livre de solvente, para a rROL imobilizada em Eupergit C, durante a acidólise de azeite virgem extra com C8:0 e de C10:0 para produção de MLM. A 25 °C os valores de incorporação de C8:0 e de C10:0 foram menores, 12,6 e 19,6 mol-%, respetivamente. Foi concluído que a temperatura da reação é um fator importante em reações de acidólise catalisadas por lipases e que, geralmente, temperaturas mais altas promovem maiores rendimentos em reações endotérmicas.

Em 2012, Nunes e colaboradores continuaram estes estudos, ao otimizarem a produção de MLM catalisada pela rROL. Foram determinadas como condições ótimas uma razão molar C8:0/TAG de 2,8:1 a 37 °C, e uma razão molar C10:0/TAG de 3:1 a 35 °C, respetivamente após 48h de reação. Estes ensaios sob condições otimizadas conduziram a incorporações de 14,4 mol-% de C8:0 e de 34,7 mol-% de C10:0 nos TAG de azeite.

Apesar destes autores trabalharem em termos de incorporação molar, confirmam que é a temperaturas próximas de 40 °C que se obtêm melhores resultados.

Como já foi visto anteriormente, no decorrer da reação além de novos TAG também se formam MAG, DAG e libertam-se AGL do óleo de grinha de uva. O aumento dos consumos de TAG iniciais, C8:0 ou C10:0 ao longo da reação, não significa que estão a ser consumidos apenas para a formação de novos TAG.

Se o número de moles de C18:2 libertado fosse igual ao número de moles de C8:0 ou C10:0 consumido, isto significaria que todo o C18:2 libertado dos TAG estava a ser substituído por C8:0 ou C10:0 nos TAG do óleo de grinha de uva, à mesma velocidade com que o C18:2 é libertado. Assim sendo, a razão entre o número de moles de C18:2 libertado pelo número de moles de C8:0 ou C10:0 consumido seria igual a 1, o que nem sempre acontece (quadro 5).

Quadro 5 – Razão entre o número de moles de ácido linoleico libertadas e o número de moles de ácido cáprico ou caprílico consumidas, para os sistemas de produção de MLM.

T (°C)	ROL - C8	ROL - C10	CPL - C8	CPL - C10
30	0,9	1,4	1,3	0,2
40	1,7	1,4	3,2	2,4
50	0,8	0,6	1,1	0,4

Se a quantidade de C18:2 libertado for muito maior que a quantidade de C8:0 ou C10:0 consumido, significa que (i) o primeiro passo da acidólise que consiste na quebra da ligação

éster no TAG com libertação do C18:2, é mais rápida do que o passo seguinte de esterificação, ou que, (ii) a hidrólise está a ocorrer em grande extensão.

No quadro 5 é de notar que a 30 e a 50 °C os valores das razões são em torno de 1, ou inferiores a 1, mas a 40 °C os valores das razões são bastante maiores. Tal que significa que, como é a 40 °C que se obtiveram maiores rendimentos em TAG novos, as grandes quantidades de C18:2 presentes no meio reacional provêm fundamentalmente da primeira etapa de acidólise e não da hidrólise. No entanto, para todos os sistemas estudados, observou-se uma situação de *quasi*-equilíbrio relativamente à produção de TAG novos, após 24h de reação. Isto indica que nestes sistemas e nas condições utilizadas, se atingiu o máximo de produção destes lípidos estruturados.

É de realçar a complexidade deste sistema, sendo por isso muito importante entender o que existe no início (substratos) e o que se pode, ou não, formar ao longo da reação (produtos). Assim, e de forma a clarificar a complexidade deste sistema, foi elaborado o esquema da figura 2.5. (c.f. 2.2.2.2.3), que apresenta os substratos e alguns dos possíveis produtos de reação.

É importante lembrar que o processo de quantificação dos ácidos gordos libertados e dos novos TAG, DAG e MAG formados é difícil, pois não se tem curvas de calibração para todos eles. Admitiu-se também que todos os TAG novos que se estão a produzir têm a mesma resposta da trioleína, o que não é verdade. Outro aspeto a salientar é que não se sabe ao certo qual a estrutura dos TAG novos formados, ou seja, se têm uma ou duas substituições.

#### 4.5. Estabilidade operacional dos biocatalisadores

O elevado custo das lipases, em conjunto com uma baixa estabilidade operacional, foram reconhecidos como os principais obstáculos para a utilização de processos catalisados por enzimas na indústria alimentar. O uso de lipases imobilizadas estáveis e reutilizáveis é uma forma de tornar o processo enzimático competitivo (Mateo *et al.*, 2007). Para escolher o melhor biocatalisador para a produção de MLM, foram efetuados estudos de estabilidade operacional.

No caso do presente trabalho prático, utilizaram-se lipases não comerciais, com o objetivo de diminuir os custos associados à utilização de lipases comerciais. Avaliar a estabilidade operacional é importante quando se pretende conhecer a forma como o biocatalisador se comporta ao longo do decorrer da reação em reatores contínuos ou de reutilização em descontínuo.

Assim, realizaram-se 5 reutilizações sucessivas dos biocatalisadores, a 40 °C, com a duração de 48h cada. Os dados da atividade residual e os modelos de inativação dos biocatalisadores são apresentados na figura 4.12..



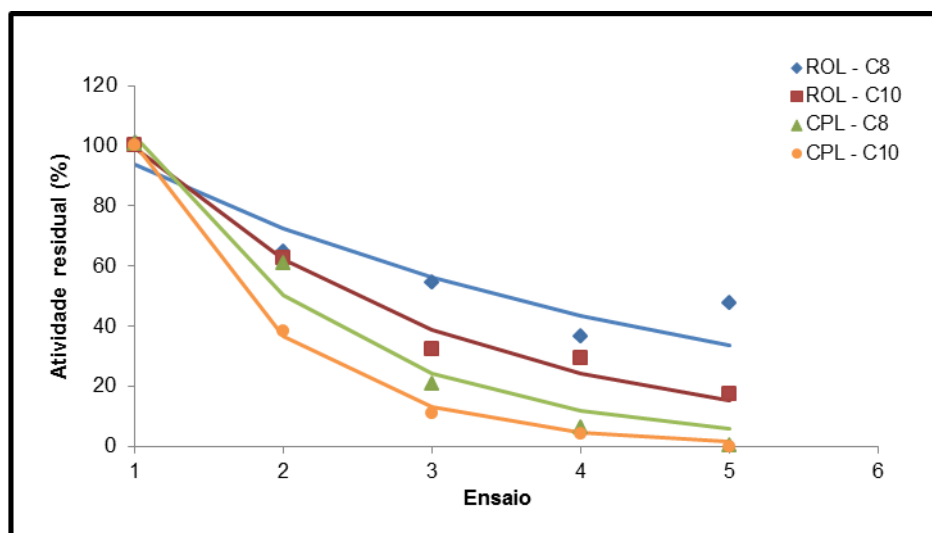


Figura 4.12. – Atividade residual dos biocatalisadores ao fim de 5 reutilizações de 48h a 40 °C, para a produção de MLM, medida pelo rendimento em TAG novos.

Ambos os biocatalisadores utilizados apresentaram um modelo de inativação exponencial de primeira ordem, descrito pela equação 20:

$$A_n = Ae^{-k_d n} \quad (\text{Equação 20})$$

Onde  $A_n$  é a atividade residual do biocatalisador na reutilização  $n$ ,  $A$  é uma constante,  $K_d$  é a constante da velocidade de inativação (número de reutilização)<sup>-1</sup> e  $n$  é o número da reutilização de 48h.

O modelo de inativação ajustado aos dados experimentais é dado pelas respectivas equações sobre a produção de TAG novos por acidólise entre o ácido caprílico (equação 21) ou o ácido cáprico (equação 22) com os TAG do óleo de graminha de uva, catalisada pela rROL:

$$A_n = 120,92e^{-0,25n} \quad (\text{Equação 21})$$

(Coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,8454$ )

$$A_n = 158,27e^{-0,47n} \quad (\text{Equação 22})$$

(Coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,9839$ )

Os tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) estimados para a rROL imobilizada em IRA96 foram de 166 h e de 91h, respectivamente, na presença de C8:0 e de C10:0.

Nunes *et al.* (2011) produziram MLM por acidólise entre os TAG do azeite e C8:0 e C10:0, catalisada pela rROL imobilizada em Eupergit C. Os ensaios também decorreram a 40 °C, em

meio livre de solvente, com razão molar TAG:AGL de 1:2, durante 13 reutilizações sucessivas de 23h cada. O tempo de meia vida para este biocatalisador na presença de C8:0 foi de 159h e na presença de C10:0 foi de 136h. A lipase rROL revelou assim ter maior estabilidade operacional quando em presença de C8:0 do que em presença de C10:0, à semelhança do que foi observado no presente trabalho. De facto, o aumento do tamanho da cadeia carbonada do ácido gordo, utilizado como dador do grupo acilo, pode estar associado a uma redução da estabilidade operacional do biocatalisador (Nunes *et al.*, 2011).

Quando a rROL foi imobilizada em Lewatit VP OC 1600, mantendo-se as mesmas condições do sistema anterior, Nunes *et al.* (2012) observaram que a perda de atividade residual obedeceu a uma cinética de inativação de primeira ordem e o tempo de meia vida obtido foi de 49h, muito inferior ao do ensaio anterior para a rROL imobilizada em Eupergit C, na presença de C10:0 (Nunes *et al.*, 2011). Um tempo de meia vida bastante superior foi obtido após ter sido efetuada uma re-hidratação do biocatalisador ( $t_{1/2} = 234h$ ), pelo que se concluiu que a inativação, naquele caso, foi devida a uma desidratação (Nunes *et al.*, 2012).

Tecelão *et al.* (2012) também estudaram o comportamento da rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e em Accurel MP 1000, na produção de HMFS por acidólise entre tripalmitina e ácido oleico. Os ensaios decorreram a 60 °C, em meio livre de solvente e cada reutilização tinha a duração de 23h. Para ambos os biocatalisadores foi observado um modelo cinético de inativação linear com tempos de vida estimados de 34h e de 64h, respetivamente, para a rROL imobilizada em Accurel MP 1000 e em Lewatit VP OC 1600. Como a rROL imobilizada em Lewatit VP OC 1600 apresentou resultados mais promissores, foi realizado um estudo para avaliar a influência da re-hidratação entre reutilizações consecutivas, na estabilidade operacional. Foi observado um aumento na estabilidade operacional para rROL imobilizada em Lewatit após a re-hidratação no final de cada reutilização ( $t_{1/2} = 202h$ ). Assim, os autores concluíram que a perda de atividade poderá ser explicada por uma desidratação progressiva que ocorre ao longo da reação.

Também Simões *et al.* (2014) avaliaram a estabilidade operacional da rROL imobilizada em Accurel MP 1000 para a produção de HMFS por acidólise entre a banha em rama e um concentrado PUFA. Os ensaios de estabilidade operacional foram realizados a 40 °C e após re-hidratação, o tempo de meia vida estimado para o biocatalisador foi de 112h.

A maior estabilidade operacional observada quando se re-hidrata a rROL está de acordo com a maior atividade de interesterificação observada para esta lipase em meios de maior  $a_w$  (Faustino, 2014). Por esta razão, a rROL imobilizada em IRA96 foi sempre utilizada a uma  $a_w$  inicial de 0,95.

Relativamente aos ensaios do presente trabalho, em que foi utilizada a lipase de *Carica papaya*, cerca de metade da sua atividade inicial foi perdida logo na segunda reutilização. Ao fim das cinco reutilizações a sua atividade era praticamente nula. O facto da lipase rROL ter sido imobilizada em suporte IRA96 também pode ser um dos fatores que contribuíram para um valor de estabilidade operacional superior ao obtido com a CPL auto-imobilizada.

O modelo de inativação ajustado aos dados experimentais é dado pelas seguintes equações de produção de TAG novos a partir da acidólise entre o ácido caprílico (equação 23) e do ácido cáprico (equação 24) com os TAG do óleo de grinha de uva, catalisada pela CPL:

$$A_n = 212,22e^{-0,72n} \quad (\text{Equação 23})$$

(Coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,9681$ )

$$A_n = 276,36e^{-1,01n} \quad (\text{Equação 24})$$

(Coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,9982$ )

O tempo de meia vida estimado para a lipase de *Carica papaya* foi maior na presença de C8:0 (96h) do que na presença de C10:0 (81h).

A lipase de *Carica papaya* foi utilizada em outros estudos, nomeadamente por Tecelão *et al.* (2011) para a produção de HMFS a partir de tripalmitina e ácido oleico. Os ensaios de estabilidade operacional decorreram a 60 °C, com diferentes razões molares C18:1/ PPP (2:1 e 6:1), a fim de investigar o efeito da concentração de ácidos gordos livres no meio reacional para a estabilidade desta lipase. Cada reutilização teve a duração de 23h, num total de 7 reutilizações. Após a segunda reutilização o biocatalisador reteve apenas 44,6 % da sua atividade inicial, quando a razão molar utilizada foi de 6:1. Nos ensaios com razão molar de 2:1, o biocatalisador apresentou-se mais estável, pois no fim da terceira reutilização ainda apresentava 71,5 % da sua atividade inicial. Deste estudo concluiu-se que a baixa estabilidade operacional observada na reação com razão molar de 6:1 podia ser devida a uma sensibilidade da enzima para os ácidos gordos livres.

Assim, pode-se concluir que os resultados obtidos com esta lipase são aceitáveis, pois apresenta baixa atividade de acidólise na presença de AG polinsaturados (Tecelão *et al.*, 2012; Simões *et al.*, 2014) e baixa estabilidade operacional na presença de grandes quantidades de AGL (Tecelão *et al.*, 2011).

## 5. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No trabalho desenvolvido no âmbito da presente tese, estudou-se a produção de lípidos estruturados catalisada por lipases não comerciais *sn*-1,3 seletivas, nomeadamente, a lipase heteróloga de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Amberlite<sup>TM</sup> IRA96, e a lipase da *Carica papaya* auto-imobilizada no látex.

Investigou-se a síntese de sucedâneos da gordura de leite humano, por acidólise entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres do óleo de gralha de uva e a síntese de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM, por acidólise entre óleo de gralha de uva e ácidos gordos de cadeia média (ácido caprílico ou ácido cáprico). Ambos os ensaios decorreram em descontínuo, em meio livre de solvente, com razão molar TAG:AGL de 1:2, durante 48h e a temperaturas variáveis consoante os objetivos pretendidos.

Não ocorreu produção de sucedâneos da gordura de leite humano nos ensaios catalisados pela lipase de *Carica papaya*. Este resultado está de acordo com o descrito por outros autores, ao verificarem a baixa atividade de acidólise desta lipase na presença de ácidos gordos polinsaturados (Tecalão *et al.*, 2012; Simões *et al.*, 2014). Nos ensaios catalisados pela rROL, obteve-se um rendimento em TAG novos (HMFS) de apenas 10,4 % (m/m).

Nos ensaios de produção de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM, os rendimentos em TAG novos obtidos para a rROL foram de 66,8 e 54,3 % (m/m), e para a lipase de *Carica papaya* de 40,8 e 36,2 % (m/m), respetivamente, para o C8:0 e C10:0, após 48h de reação. Estes resultados revelaram a preferência de ambas as lipases pelo C8:0. Uma atividade hidrolítica muito elevada, obtida para a CPL (6982 U/g), não se traduziu numa atividade de acidólise igualmente elevada.

Face aos resultados obtidos, prosseguiu-se com o estudo da síntese de triacilgliceróis dietéticos do tipo MLM em detrimento dos sucedâneos da gordura de leite humano, uma vez que estes não apresentaram rendimentos em TAG novos que compensassem ser estudados mais aprofundadamente.

Os ensaios realizados ao longo do tempo para a síntese de MLM, mostraram que o andamento das reações de acidólise a 30, 40 ou 50 °C foi semelhante para ambos os biocatalisadores e que produção de TAG novos atingiu na maioria dos casos um equilíbrio, às 24h de reação, para as três temperaturas em estudo.

Através do estudo da cinética da reação, concluiu-se que temperaturas mais elevadas correspondem a maiores velocidades iniciais de formação de TAG novos, mas que não significam maiores rendimentos em TAG novos, às 48h de reação.

Verificou-se também, para os quatro sistemas em estudo, um aumento da produção de TAG novos de 30 para 40 °C, e uma diminuição de 40 para 50 °C. Foi à temperatura de 40 °C que se registaram maiores produções de TAG novos e maiores libertações de ácido linoleico. A presença de ácidos gordos livres no meio reacional pode ter origem na primeira etapa da acidólise e/ou na hidrólise dos TAG, que é a reação competitiva da interesterificação.

Por fim, implementaram-se, para os sistemas de produção de MLM, ensaios de estabilidade operacional com 5 reutilizações sucessivas do biocatalisador em ensaios de 48h cada. Obtiveram-se tempos de meia vida de 166 e 91h e para a rROL e 96 e 81h para a lipase de *Carica papaya*, respetivamente, em presença de C8:0 e C10:0. Estes resultados revelaram uma maior estabilidade operacional de ambos os biocatalisadores para o C8:0, e um bom ajuste do modelo exponencial de primeira ordem para os quatro sistemas em estudo.

Assim, concluiu-se que o melhor sistema para a síntese de MLM foi o rROL–C8:0, pois foi o que apresentou maiores rendimentos em TAG novos e maior estabilidade operacional, para os meios reacionais e condições de ensaio estabelecidos.

Em suma, apesar da rROL imobilizada em IRA 96 apresentar produções de TAG novos de cerca de 1,5 vezes superior às obtidas pela lipase de *Carica papaya*, ambas as lipases não comerciais testadas demonstraram ser biocatalisadores com potencial para a síntese de TAG dietéticos do tipo MLM, como alternativa às lipases comerciais. No entanto, devem ser realizados investimentos no sentido de aumentar a estabilidade destes biocatalisadores com o intuito de implementar processos economicamente viáveis à escala industrial.

O estudo realizado ao longo da presente tese cria a possibilidade de se desenvolverem trabalhos futuros, no sentido de complementar o trabalho realizado, que poderão basear-se nas seguintes sugestões:

- Testar a possibilidade de imobilização da rROL noutros suportes, para além de Amberlite™ IRA96, estudando diferentes razões carga de lipase/suporte;
- Realizar re-hidratações entre as reutilizações sucessivas nos ensaios de estabilidade operacional no sentido de aumentar o tempo de meia-vida dos biocatalisadores;
- Investigar os fatores determinantes da desativação enzimática, com vista ao seu controlo e à reativação completa do biocatalisador (e.g. desidratação, inativação por produtos de oxidação);
- Desenvolver uma técnica capaz de identificar a estrutura dos TAG novos produzidos, ou seja, saber se têm uma ou duas substituições, como seja a utilização de um espectrómetro de massa acoplado ao cromatógrafo gasoso;
- Avaliar a digestibilidade *in vitro* dos MLM produzidos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlercreutz, D., Budde, H., Wehtje, E., (2002), Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the *sn*-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction, *Biotechnol. Bioeng.*, 78: 403-411.
- Akoh, C. C., (1995), Structured Lipids – enzymatic approach, *Inform* 6: 1055-1061.
- Akoh, C. C., (1998), Structured lipids, In: *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, (Akoh, C. C., Min, D. B., Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 699-727.
- Akoh, C. C., Lee, K. T., (1998), Structured lipids: Synthesis and applications, *Food Reviews International*, 14 (1): 17-34.
- Akoh, C. C., Long, K. D., Flatt, W. P., Rose, B. S., Martin, R. J., (1998), Effects of a structured lipid, Captex, and a protein-based fat replacer, Simplese, on energy metabolism, body weight, and serum lipids in lean and obese Zucker rats, *Nutricional Biochemistry*, 9: 267-275.
- Akoh, C., C., Min, D., B., (2002), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> Ed., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1014.
- Arnau, C., Ramón, R., Casas, C., Valero, F., (2010), Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess, *Enzyme Microb. Technol.*, 46: 494-500.
- Babayan, V. K., (1987), Medium chain triglycerides and structured lipids, *Lipids*, 22: 417-420.
- Bailey, J. E., Ollis, D. F., (1986), Applied enzyme catalysis. In: *Biochemical Engineering Fundamentals*, (Verma, K., Martin, C. C., Eds.), McGraw-Hill International Editions, pp.157-227.
- Bell, S. J., Bradley, D., Forse, R. A., Bistrain, B. R., (1997), The new dietary fats in health and disease, *J. Am. Dietetic Assoc.*, 97 (3): 280-286.
- Blackwood, A. D., Curran, L. J., Moore, B. D., Halling, P. J., (1994), "Organic phase buffers" control biocatalyst activity independent of initial aqueous pH, *Biochim. Biophys. Acta*, 1206: 161-165.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1992), Kilogram-scale ester synthesis of acyl donor and use in lipase-catalyzed interesterification, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69(10): 966-973.
- Bradford, M. M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Campos, L., (1998), *Entender a Bioquímica: o Metabolismo Fundamental em Animais e Plantas*, Escolar Editora, Lisboa, pp. 290.

- Casas-Godoy, L., Marty, A., Sandoval, G., Ferreira-Dias, S., (2013), Optimization of medium chain length fatty acid incorporation into olive oil catalyzed by immobilized Lip2 from *Yarrowia lipolytica*, *Bioch. Eng. J.*, 77: 20-27.
- Colla, L. M., Rizzardi, J., Pinto, M. H., Reinehr, C. O., Bertolin, T. E., Vieira, C. J. A., (2010), Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses, *Bioresour Technol.*, 101: 8308-8314.
- Correia, A. C., Ferreira-Dias, S., (1998), The effect of impurities of crude olive residue oil on the operational stability of the *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, In: *Stability and Stabilization of Biocatalysts* (Ballesteros, A., Plou, F. J., Iborra, J. L., Halling, P., Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 71-76.
- Da Silva, R. C., Escobedo, J. P., Gioielli, L. A., (2007), Centesimal composition of milk and physico-chemical properties of its fat, *Quim. Nova*, 30 (7): 1535-1538.
- Domínguez de María, P., Sinisterra, J. V., Tsai, S., Alcántara, A. R., (2006), *Carica papaya* lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst, *Biotechnol. Adv.*, 24: 493–499.
- Dünhaupt, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J. E., (1992), *Biological Reaction Engineering*, pp. 56-59.
- Eigtved, P., Hansen, T. T., Sakaguchi, H., (1986). Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions, In: *AOCS/JAOCS Meeting*, Honolulu, citado por Nunes, P. A., (2011), *Produção de Triacilgliceróis Estruturados Catalisada por Lipases Imobilizadas*, Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 82 pp.
- EN 14105:2011 (E), Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents, *European Committee for Standardization*, Brussels, pp.21.
- Erickson, M. D., (1995), Interesterification, In: *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, (Erickson, D. R., Ed.), AOCS Press and United Soybean Board, pp. 277-296.
- Faustino, A. R. V., (2014), *Síntese de Sucedâneos da Gordura de Leite Humano Enriquecidos em Ácidos Gordos Polinsaturados Ômega-3 do Óleo de Camelina, Catalisada pela Lipase Heteróloga de Rhizopus oryzae*, Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 100 pp.
- Ferreira-Dias, S., (2010), Enzymatic production of functional fats, In: *Comprehensive Food Fermentation Biotechnology*, (Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C. R., Gnansounou, E., Nigam P., Eds.), vol. II, Asiatech Publishers Inc., New Deli, India, 19: 608-641.

- Fomuso, L. B., Akoh, C. C., (2002), Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor, *Food Res. Int.*, 35: 15-21.
- Forsyth, J. S., (1998), Lipids and infant formulas, *Nutr. Res. Rev.*, 11: 255-278.
- Gamboa, O. W. D., Gioielli, L. A. (2006), Comportamento de cristalização de lípidos estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe, *Quím. Nova*, 29 (4): 646-653.
- Gunstone, F. D., (1998). Movements towards tailor-made fats, *Prog. Lipid Res.*, 37 (5): 277- 305.
- Hamam, F., Shahidi, F., (2008), Incorporation of selected long-chain fatty acids into trilinolein and trilinolenin, *Food Chem.*, 106: 33-39.
- Haumann, B. F., (1994), Tools: hydrogenation, interesterification, *Inform 5* (6): 668-678.
- Holm, H. C., Cowan, D., (2008), The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 110: 679-691.
- Howlett, J., (2008), *Functional Foods: From Science to Health and Claims*, ILSI Europe publications, pp.36.
- Huang, K., Akoh, C. C., (1994), Lipase-catalyzed incorporation of *n*-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 1277-1280.
- Hustedt, H. H., (1976), Interesterification of edible oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53: 390-392.
- Jensen, R. G., (1989), Lipids in human milk—Composition and fatsoluble vitamins, In: *Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy*, (Lebenthal, E., ed.), 2<sup>nd</sup>Ed., Raven Press, New York , USA, 157-208.
- Jensen, R. G., Ferris, A. M., Lammi, C. J., (1992), Lipids in human milk and infant formulas, *Annual Review of Nutrition*, 12: 417-441.
- Kamini, N. R., Fujii, T., Kurosu, T., Lefuji, H., (2000), Production, purification and characterization of an extracellular lipase from yeast, *Cryptococcus sp.* S-2, *Process Biochem.*, 36: 317-24.
- Kawashima, A., Yuji, S., Nagao, T., Ohara, A., Matsuhisa, T., Sugihara, Tominaga, Y., (2002), Production of structured TAG rich in 1,3-dicapryloyl-2- $\gamma$ -linolenoyl glycerol from borage oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79: 871-877.
- Kim, B. H., Akoh, C.C., (2005), Modeling of lipase-catalyzed acidolysis of sesame oil and caprylic acid by response surface methodology: optimization of reaction conditions by considering both acyl incorporation and migration, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8033-8037.
- Knežević, Z. D., Šiler-Marinković, S. S., Mojović, L. V., (2004), Immobilized lipases as practical catalysts, *APTEFF*, 35: 151-164.
- Konishi, H., Neff, W. E., Mounts, T. L., (1993), Chemical interesterification with regioselectivity for edible oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70: 411-415.



- Lopez-Hernandez, A., Otero, C., Hernández-Martín, E., Garcia, H. S., Hill J., C. G., (2007), Interesterification in batch and continuous flow processes of sesame oil and fully hydrogenated fat catalyzed by immobilized lipase, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109: 1147-1159.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., Amundson, H., (1990), Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – a review, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67 (12): 890-910.
- Marangoni, A. G., Rousseau, D., (1995), Engineering of triacylglycerols: the role of interesterification, *Trends in Food Science & Technology*, 6(10): 329-335.
- Martinek, K., Semenov, A. N., A. N., Berezin, I. V., (1981), Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems, *Biochim. Biophys. Acta*, 658: 76:89.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., (2007), Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.*, 40:1451-1463.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., Waldron, K. C., (2004), Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques*, 37: 790-802.
- Moreno, P. A., Medina, A. R., Rubio, F. C., Páez, B. C., Grima, E. M., (2004), Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: analysis of three different operation modes, *Biotechnol. Progr.*, 20: 1044-1052.
- Nagao, T., Kawashima, A., Sumida, M., Watanabe, Y., Akimoto, K., Fukami, H., Sugihara, A., Shimada, Y., (2003), Production of structured TAG rich in 1,3-capryloyl-2-arachidonoyl glycerol from *Mortierella* single-cell oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80: 867- 872.
- Nascimento, A. C., Tecelão, C. S. R., Gusmão, J. H., da Fonseca, M. M. R., Ferreira-Dias, S., (2004), Modelling lipase-catalysed transesterification of fats containing *n*-3 fatty acids monitored by their solid fat content, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 106(9): 599-612.
- Nunes, P. A., (2011), *Produção de Triacilgliceróis Estruturados Catalisada por Lipases Imobilizadas*, Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 82 pp.
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., Guillén, M., Valero, F., Ferreira-Dias, S., (2012), Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids, *Bioch. Eng. J.*, 67: 265-268.
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., Guillén, M., Valero, F., Luna, D., Ferreira-Dias, S. (2011), Production of MLM-type structured lipids catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88: 473-480.
- Okumura, S., Iwai, M., Tsujisaka, Y., (1979), Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases, *BBA-Mol. Cell Biol. Lipids*, 575: 156-65.

- Osborn, H. T., Akoh, C. C., (2002) Structured Lipids - Novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Compr. Rev. in Food Sci. and Food Saf.*, 3: 110-120.
- Osório, N. M., da Fonseca, M. M., Ferreira-Dias, S., (2006), Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during fats interesterification in continuous-packed-bed reactors, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 108: 545-553
- Osório, N. M., Ferreira-Dias, S., Gusmão, J. H., da Fonseca, M. M. R., (2001), Response surface modelling of the production of w-3 polyunsaturated fatty acids enriched fats by a commercial immobilized lipase, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 677-686.
- Öztürk, T., Ustun, G., Aksoy, H. A., (2010), Production of medium-chain triacylglycerols from corn oil: optimization by response surface methodology, *Bioresource Technol.*, 101: 7456-7461.
- Pande, G., Sabir, J. S. M., Baeshen, N. A., Akoh, C. C., (2013), Synthesis of infant formula fat analogs enriched with DHA from extra virgin olive oil and tripalmitin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 90: 1311-1318.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T., (1999), Review: the realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29: 119-31.
- Petersson, A. E. V., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (2007), A water activity control system for enzymatic reactions in organic media, *Biotechnol. Bioeng.*, 97: 235-241.
- Picciano, M. F., (1998), Human milk: nutritional aspects of a dynamic food, *Biol. Neonates*, 74: 84-93.
- Reetz, M. T., (2002), Lipases as practical biocatalysts, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 145-150.
- Ribeiro, E. P., Seravalli, E. A. G., (2007), *Química de Alimentos*, 2ª Edição, Edgard Blücher, Instituto Mauá de Tecnologia, São Paulo, pp. 184.
- Rosevear, A., Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S., Hilger, A., (1987), Types of stability, In: *Immobilised Enzymes and Cells*, Bristol and Philadelphia, pp. 148-170.
- Rosseau, D., Marangoni, A. G., (2002), Enzymatic interesterification. In: *Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> Ed., (Akoh, C. C., Min, D. B., Eds.), Marcel Dekker Inc., New York: 319-381.
- Rousseau, D., Marangoni, A. G., (1999), The effects of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil spreads, *Food Res. Int.*, 31(5): 381-388.
- Rubin, M., Moser, A., Vaserberg, F., Levy, Y., Spivak, H., Ziv, Y., Lelcuk, S., (2000), Structured triacylglycerol emulsion containing both medium and long chain fatty acids, in long-term home parenteral nutrition: a double-blind randomized cross-over study, *Nutrition*, 16(2): 95-100.

- Sahín, N., Akoh, C. C., Karaali, A., (2005), Lipase-catalysed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5779-5783.
- Sellapan, S., Akoh, C., (2001), Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalysed by Lipozyme IM60, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2071-2076.
- Severino, A. C. F., (2014), *Produção de Sucedâneos da Gordura de Leite Humano a Partir de Tripalmitina e de Óleo de Graminha de Uva, Catalisada por Lipases Imobilizadas*, Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 55 pp.
- Silva, J. R. I., (2009), *Produção de Sucedâneos de Gordura de Leite Materno Enriquecidos em Ácidos Gordos Polinsaturados Ômega-3, Catalisada por Enzimas Imobilizadas*, Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 76 pp.
- Simões, T. F. S., (2011), *Síntese Enzimática de Lípidos Estruturados Sucedâneos de Gordura de Leite Humano, Enriquecidos em Ácidos Gordos Polinsaturados*, Dissertação para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinho, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Instituto Politécnico de Leiria, Leiria, Portugal, 73 pp.
- Simões, T., Valero, F., Tecelão, C., Ferreira-Dias, S., (2014), Production of human milk fat substitutes catalyzed by a heterologous *Rhizopus oryzae* lipase and commercial lipases, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91:411–419.
- Soares, C. M. F., Castro, H. F., de Moraes, F. F., Zanin, G. M., (1999), Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 79: 745–75.
- Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., Menge, U., Schmid, R. D., (1997), Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 427-433.
- Srivastava, A., Akoh, C. C., Chang, S. W., Lee, G. C., Shaw, J. F., (2006), *Candida rugosa* lipase LIP1-catalyzed transesterification to produce human milk fat substitute, *J. Agric. Food Chem.*, 54: 5175-5181.
- Statistical report on world vitiviniculture, (2012), *Internacional Organisation of Vine and Wine*, Paris, France, pp. 32.
- Straarup, E. M., Hoy, C. E., (2000), Structured lipids improve fat absorption in normal and malabsorbing rats, *J. Nutr.*, 130 (11): 2802-2808.
- Svensson, I., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1992), Lipase-catalysed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69: 986-991.
- Tecelão, C. S. R., (2011), *Produção de Sucedâneos da Gordura de Leite Humano por Catálise Enzimática*, Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Engenharia

Alimentar, Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 140 pp.

- Tecelão, C., Rivera, I., Sandoval, C., Ferreira-Dias, S., (2012), *Carica papaya* latex: A low cost biocatalyst for human milk fat substitutes production, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114: 266–276
- Tecelão, C., Silva, J., Dubreucq, E., Ribeiro, M. H., Ferreira-Dias, S., (2010), Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase, *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 65: 122-127.
- Torres, C. F., Lin, B., Moeljadi, M., Hill, J., C. G., (2003), Lipase-catalyzed synthesis of designer acylglycerols rich in residues of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, conjugated linoleic, and/or stearic acids, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 105: 614-623.
- Turner, N. A., Duchateau, D. B., Vulfson, E. N., (1995), Effects of hydration on thermostability on serine esterases, *Biotech. Letts*, 17: 371-376.
- Vikbjerg, A. F., Mu, H., Xu, Xuebing, (2006), Elucidation of acyl migration during lipase-catalyzed production of structured phospholipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 83 (7): 609-14.
- Wang, Y., Shen, X., Li, Z., Li, X., Wang, F., Nie, X., Jiang, J., (2010), Immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for the production of biodiesel in solvent free system, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67: 45-51.
- Webb, D. R., Sanders, R. A., (1991), Caprenin 1: Digestion, absorption, and rearrangement in thoracic duct cannulated rats, *Int. J. Toxicol.*, 10: 325-340.
- Willis, W. M., Lencki, R. W., Marangoni, A. G., (1998), Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils, *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, 38: 1-36.
- Willis, W. M., Marangoni, A. G., (1999), Assessment of lipase and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(4): 443-450.
- Willis, W. M., Marangoni, A. G., (2002), Enzymatic interesterification. In: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> Ed., (Akih, C. C., Min, D. B., Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 857-894.
- Xu, X., (2000), Production of specific structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 102: 287-303.
- Xu, X., (2003), Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 105: 289-304.
- Xu, X., Balchen, S., Hoy, C. E., Adler-Nissen, J., (1998a), Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75 (2): 301-308.
- Xu, X., Balchen, S., Hoy, C. E., Adler-Nissen, J., (1998b), Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot continuous enzyme bed reactor, *J. Am Oil Chem. Soc.*, 75: 1573-1579.

- Yamane, T., (1988), Importance of moisture contents control for enzymatic reactions in organic solvents, a novel concept of “microaqueous”, *Biocatalysis*, 2(1): 1-8.
- Yang, T., (2003), Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, *Food Chemistry*, 80 (4): 473-481.

### **Cibergrafia**

- <http://www.betapol.com/en/why-is-betapol-the-best-alternative> (consultado em Agosto de 2014).
- <http://www.lenntech.com/Data-sheets/Amberlite-IRA-96-L.pdf> (consultado em Agosto de 2014).
- <http://www.advancedlipids.com/infat.html> (consultado em Agosto de 2014).